

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003年8月7日 (07.08.2003)

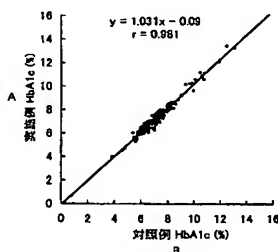
PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/064683 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12Q 1/26, G01N 33/50, 33/15
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/00820
- (22) 国際出願日: 2003年1月29日 (29.01.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-23897 2002年1月31日 (31.01.2002) JP  
特願2002-23898 2002年1月31日 (31.01.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アークレイ株式会社 (ARKRAY, INC.) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 米原 聡 (YONEHARA, Satoshi) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP). 石丸 香 (ISHIMARU, Kaori) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP). 小森 嵐樹 (KOMORI, Tsuguki) [JP/JP]; 〒501-4222 岐阜県郡上郡八幡町島谷1229 Gifu (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ (IKEUCHI SATO & PARTNER PATENT ATTORNEYS); 〒530-6026 大阪府大阪市北区天満橋1丁目8番30号OAPタワー26階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF QUANTIFYING GLYCOSYLATED PROTEIN USING REDOX REACTION AND QUANTIFICATION KIT

(54) 発明の名称: 酸化還元反応を用いた糖化タンパク質の測定方法および測定キット



A...EXAMPLE HbA1c (%)  
B...CONTROL HbA1c (%)

(57) Abstract: It is intended to provide a method of quantifying a glycosylated protein using a redox reaction whereby a high quantification accuracy and a high quantification sensitivity can be achieved. In order to eliminate glycosylated amino acids contained in a sample separately from a glycosylated protein, the glycosylated amino acids are preliminarily degraded by treating with fructosylamino acid oxidase. Then, the glycosylated protein in the sample is treated with fructosylamino acid oxidase in the presence of a tetrazolium compound and sodium azide and the redox reaction is measured, thereby quantifying the glycosylated protein. Glycosylated hemoglobin is favorable as the glycosylated protein.

WO 03/064683 A1



---

(57) 要約:

酸化還元反応を用いた糖化タンパク質の測定方法であって、測定精度および測定感度に優れた方法を提供する。試料中に糖化タンパク質とは別に存在する糖化アミノ酸を除去することを目的として、予め、糖化アミノ酸にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを作用させて分解し、その後、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムの存在下で、試料中の糖化タンパク質に、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを作用させて、その酸化還元反応を測定することにより、糖化タンパク質量を求める。糖化タンパク質としては、糖化ヘモグロビンが好ましい。

## 明 細 書

酸化還元反応を用いた糖化タンパク質の測定方法および測定キット

## 技術分野

本発明は、本発明は、酸化還元反応を用いた糖化タンパク質の測定方法および測定キットに関する。

## 背景技術

糖化タンパク質の中でも、例えば、血液中の糖化ヘモグロビン（糖化Hb）は、生体内血糖値の過去の履歴を反映しているため、糖尿病の診断や治療等における重要な指標とされている。

このような糖化Hbは、例えば、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法、ミニカラム法、免疫法、色素法等により、糖化率や糖化量として測定されている。しかし、前記HPLC法の場合は、例えば、糖化Hbを測定するための専用機が必要であり、また、免疫法や色素法では、例えば、測定用のセルの汚れや測定精度等に問題があった。

そこで、糖化Hb等の糖化タンパク質について、特殊な測定機器が不要であり、操作も簡便である酵素による酸化還元反応を用いた測定方法が、例えば、生化学分析や臨床検査等において適用されている。

前記酸化還元反応を用いた糖化Hbの測定は、例えば、以下に示すようにして行われる。まず、糖化Hbを含む試料をフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（以下、「FAOD」という）で処理し、糖化Hbの糖化部分に作用させて過酸化水素を発生させる。この過酸化水素量は、前記糖化Hb量に対応する。そして、このFAOD処理後の前記試料に、ペルオキシダーゼ（以下、「POD」という）および還元剤を添加し、前

記 P O D を触媒として前記過酸化水素と前記還元剤との間で酸化還元反応させる。この時、前記還元剤として、酸化されることにより発色する還元剤を用いれば、その発色の測定により前記過酸化水素量を測定でき、この結果、試料中の糖化 H b 量を知ることができる。

5

#### 発明の開示

しかし、このような従来の測定方法は、測定感度が十分ではない。また、測定精度に関しては、例えば、実際に試料中に含まれる糖化 H b に対応する以上の過酸化水素が発生したり、患者によっては一時的に糖化 H b の測定値が急激に増加するという現象が見られることがあるため、さらなる精度の向上が求められている。

そこで、本発明の目的は、試料中の糖化タンパク質を、酸化還元反応を用いて測定する方法の提供であって、測定感度および測定精度の両方に優れる方法の提供である。また、前記糖化タンパク質の測定に使用する、測定精度、測定感度、取り扱い性に優れる測定キットの提供である。

前記目的を達成するために、本発明の糖化タンパク質の測定方法は、試料中の糖化タンパク質に F A O D を作用させて酸化還元反応を行い、その酸化還元反応を測定することにより糖化タンパク質の量を測定する方法であって、前記試料中に糖化タンパク質とは別に存在する糖化アミノ酸を除去することを目的として、前記酸化還元反応に先立ち、前記糖化アミノ酸に F A O D を作用させて分解し、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムの存在下で、前記酸化還元反応を行うことを特徴とする。

なお、前記 F A O D は、一般名称であり、その基質としては糖化アミ

ノ酸には限られず、例えば、糖化タンパク質や糖化ペプチドにも作用する。以下、本発明において、前記糖化アミノ酸を分解するためのFAODを「分解用FAOD」といい、前記糖化タンパク質に作用させる測定のためのFAODを「測定用FAOD」という。

- 5      本発明者らは、測定精度の向上を図るべく鋭意研究を行った結果、以下の事を突き止めた。つまり、全血中には、本来、糖化タンパク質の他に遊離の糖化アミノ酸が存在しており、前記FAODは、このような糖化アミノ酸に対しても作用する。このため、前述のようなFAODを用いた糖化タンパク質の測定を行った場合、糖化タンパク質とFAODとの酸化還元反応だけでなく、糖化アミノ酸とFAODとの酸化還元反応も生じてしまい、見かけ上、糖化タンパク質の測定値が増加してしまうのである。さらに、同じ患者の全血試料について、全く同じ条件で前記測定方法により測定を行った場合でも、患者によっては採血時が異なると測定値が著しく変動するという問題に関しては、以下のような事をつ
- 10      きとめた。すなわち、このような問題は、主に、点滴等を受けた患者に見られる現象であり、このように測定値が変動するのは、点滴等の成分として、例えば、グルコース等の糖類や各種アミノ酸が含まれた場合に、これらの外来成分から糖化アミノ酸が生成され、一過的に糖化アミノ酸が増加するためであることを解明したのである。そこで、全血試料中
- 15      に恒常的な糖化アミノ酸や一過性の外来糖化アミノ酸が存在しても、本発明のように、予め糖化アミノ酸に分解用FAODを作用させて分解すれば、前述のような糖化アミノ酸による測定値の上昇が抑制されることを、本発明者らが初めて見出したのである。これによって、測定精度が向上でき、さらに、点滴を受けたか否かに関わらず、いつでも採血を行
- 20      うことができるため、患者の負担も低減できる。さらに、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムの存在下で前記酸化還元反応を行えば
- 25

、その作用機作は不明であるが、測定感度も向上する。したがって、このように測定精度および測定感度に優れる測定方法によれば、各種糖化タンパク質の指標としての信頼性も増し、臨床医療等の分野において有用な方法となる。

- 5      本発明において、前記糖化タンパク質としては、例えば、糖化Hbが好ましい。このような方法によれば、糖化Hbの糖尿病診断の指標としての信頼性が増し、臨床医療等の分野において有用となるからである。

本発明の測定方法としては、例えば、前記糖化アミノ酸と前記糖化タンパク質とに、異なる基質特異性のFAODを使用する第1の測定方法  
10      と、同じ基質特異性のFAODを使用する第2の測定方法とがあげられる。

なお、FAODには、後述するように、例えば、 $\alpha$ -アミノ基の糖化部分に作用するもの、リジンやアルギニン等のアミノ酸残基の側鎖アミノ基の糖化部分に作用するもの、および前記両方の糖化部分に作用する  
15      もの等があり、その基質特異性はFAODの種類により様々である。例えば、糖化タンパク質が糖化Hbの場合、糖化Hbの測定は、前記 $\alpha$ -アミノ基の糖化部分、前記側鎖アミノ基の糖化部分または両方の糖化部分のいずれにFAODを作用させても、その量を測定することが可能である。

20      本発明の第1の測定方法としては、前記糖化アミノ酸に作用させる分解用FAODと、糖化タンパク質に作用させる測定用FAODとが、異なる基質特異性を有することが好ましい。これによれば、分解用FAODによって前記糖化アミノ酸が分解され、糖化タンパク質については、前記分解用FAODが作用していない糖化部分に、さらに異なる基質特  
25      異性の測定用FAODを作用させることができるため、糖化アミノ酸の影響を受けず、測定精度を向上できるからである。

具体的には、例えば、前記分解用 F A O D が、糖化  $\alpha$ -アミノ基に特異的に作用し、前記測定用 F A O D が、糖化  $\alpha$ -アミノ基および糖化側鎖アミノ基に特異的に作用することが好ましい。前記測定用 F A O D は、 $\alpha$ -アミノ基糖化部分および側鎖アミノ基糖化部分の両方に作用するため、従来の方法であれば、前述のように  $\alpha$ -アミノ基が糖化された糖化アミノ酸にも作用していた。しかし、本発明においては、前記糖化アミノ酸は、予め、前記糖化  $\alpha$ -アミノ基に特異的に作用する分解用 F A O D によって分解されているため、これに測定用 F A O D が作用することはなく、見かけ上の測定値の増加が抑制されて精度が向上する。また、前記測定用 F A O D は、前述のように  $\alpha$ -アミノ基糖化部分および側鎖アミノ基糖化部分の両方に作用するが、予め、糖化タンパク質の  $\alpha$ -アミノ基糖化部分も分解用 F A O D によって分解されているため、糖化タンパク質の側鎖アミノ基糖化部分のみに測定用 F A O D を作用させることができる。このため、特に側鎖アミノ基の糖化量に特徴がある糖化 H b の測定に、有用な方法といえる。

このように異なる F A O D を用いる場合、前記糖化アミノ酸に F A O D を作用させる前または作用させた後に、糖化タンパク質をプロテアーゼで分解し、この糖化タンパク質の分解物に、前記糖化タンパク質に作用させる測定用 F A O D を作用させて前記酸化還元反応を行うことが好ましい。糖化タンパク質をプロテアーゼで分解するのは、F A O D は、糖化タンパク質よりも、糖化アミノ酸やより短い糖化ペプチド断片に作用し易いからである。また、プロテアーゼ処理の順序が、糖化アミノ酸の分解処理の前後で制限されないのは、測定用 F A O D は、前述のように分解用 F A O D とは異なる糖化部分に作用するため、糖化タンパク質の測定自体には影響を受けないからである。

つぎに、本発明の第 2 の測定方法としては、糖化アミノ酸に分解用 F

AODを作用させた後、糖化タンパク質をプロテアーゼで分解し、さらに前記分解用FAODと同じFAODを添加して、前記プロテアーゼ分解物に作用させて前記酸化還元反応を行うことが好ましい。すなわち、分解用FAODと測定用FAODとが同じ場合の測定方法である。

- 5      具体的には、前記プロテアーゼにより、前記分解用FAODを失活させることが好ましい。FAODは、前述のように測定する糖化タンパク質よりも、糖化アミノ酸やより短い糖化ペプチド断片に対して作用し易いという性質を有している。このため、分解用FAODを添加しても、酵素の反応速度論から、糖化アミノ酸を分解する処理時間においては、
- 10    糖化タンパク質にはあまり作用しないといえる。しかし、続く糖化タンパク質のプロテアーゼ処理の間も前記分解用FAOD活性が残存していると、前記プロテアーゼ処理と併行して、プロテアーゼによる糖化タンパク質分解物（すなわち糖化アミノ酸や糖化タンパク質のペプチド断片）に残存する前記分解用FAODが作用するおそれがある。そして、そ
- 15    の後、さらに測定用FAODを添加しても、すでに前記糖化タンパク質分解物の一部には前記残存する分解用FAODが作用してしまった状態となり、反対に測定精度が低下するおそれがある。したがって、前述のように糖化タンパク質を分解するためのプロテアーゼ処理によって、同時に残存する前記分解用FAODを失活させれば、プロテアーゼ処理に
- 20    よる糖化タンパク質分解物は、前記分解用FAODとは未反応のままで維持され、続いて添加する測定用FAODと反応することができる。このため測定精度も向上するのである。

- 一方、第3の測定方法として、前述のようにプロテアーゼ処理で分解用FAODを失活させなくとも、例えば、前記分解用FAODの添加量
- 25    と、測定用FAODの添加量とを調整することによっても、高精度な測定を実現できる。この場合、例えば、前記分解用FAOD（A）と測定



- 用 F A O D (B) の添加割合 (活性比 A : B) を、 $A : B = 1 : 10 \sim 1 : 1000$  の範囲に設定することが好ましい。このような添加割合であれば、プロテアーゼ処理を行う際に、前記分解用 F A O D が残存しても、酵素の反応速度論の点から、糖化タンパク質分解物には作用し難いからである。

- 本発明の測定方法において、前記プロテアーゼとしては、メタロプロティナーゼ、プロメライン、パパイン、トリプシン、プロティナーゼ K、ズブチリシンおよびアミノペプチダーゼ、Bacillus sbtillis 由来のプロテアーゼ等の少なくとも一つのプロテアーゼが使用できる。
- 10 糖化タンパク質が糖化 H b の場合、前記プロテアーゼは、糖化 H b を選択的に分解する、メタロプロティナーゼ、プロメライン、パパイン、ブタ膵臓由来トリプシンおよび Bacillus sbtillis 由来のプロテアーゼからなる群から選択された少なくとも一つのプロテアーゼであることが好ましい。この中でも好ましくはメタロプロティナーゼ、Bacillus
- 15 sbtillis 由来のプロテアーゼであり、より好ましくはメタロプロティナーゼである。測定対象物が糖化 H b の場合に、このようなプロテアーゼを作用させれば、糖化 H b 以外の糖化タンパク質や糖化ペプチドは分解され難いため、前記他の糖化タンパク質等には F A O D も作用し難く、糖化 H b のみの測定が可能になる。
- 20 本発明の測定方法において、テトラゾリウム化合物 (C) とアジ化ナトリウム (D) との添加割合 (モル比 C : D) は、 $C : D = 20 : 3 \sim 20 : 12$  の範囲であることが好ましい。また、前記酸化還元反応溶液におけるテトラゾリウム化合物の終濃度が、 $0.5 \sim 2.5 \text{ mmol/L}$  の範囲であり、前記反応溶液におけるアジ化ナトリウムの終濃度が
- 25  $0.13 \sim 1.3 \text{ mmol/L}$  の範囲であることが好ましい。

本発明の測定方法において、より一層感度を向上できることから、テ

トラゾリウム化合物とアジ化ナトリウムとを含む溶液をエージングした後、前記試料に添加することが好ましい。この場合、エージングの処理温度は、20～60℃の範囲であることが好ましく、エージングの処理時間は、6～120時間の範囲であることが好ましい。

- 5 本発明において、前記酸化還元反応の測定としては、特に制限されないが、糖化タンパク質にFAODを作用させて発生した過酸化水素と、酸化することより発色する基質（発色基質）とを酸化還元酵素により反応させ、前記発色基質の発色量を測定することによって、過酸化水素量を決定する過酸化水素量の測定等があげられる。前記発色基質としては
- 10 、例えば、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム（以下、「DA-64」ともいう）が使用できる。

- 前記DA-64を使用する場合、前記DA-64を界面活性剤存在下で反応溶液に添加し、前記反応溶液におけるテトラゾリウム化合物濃度を0.5～8mmol/Lの範囲、アジ化ナトリウム濃度を0.08～
- 15 0.8mmol/Lの範囲および界面活性剤濃度を0.3～10mmol/Lの範囲とし、かつ前記反応溶液のpHを7.0～8.5とすることが好ましい。

- 本発明は測定感度の向上のため、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムの存在下で前記酸化還元反応を行うことを特徴の一つとして
- 20 いるが、前述のように、発色基質としてDA-64を使用すると、このDA-64と、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムとが共存することによって、DA-64が誤発色を起こす場合がある。このように誤発色が生じると、例えば、発色量の測定においてバックグラウンドが高くなり、また、十分量添加したはずのDA-64が不足するという
- 25 問題が生じる。しかし、このように界面活性剤の存在下でDA-64を添加し、かつ各成分濃度を前記濃度範囲に設定し、反応溶液のpHを前

記範囲に設定すれば、前記バックグラウンドの上昇も抑制でき、より一層高精度な測定が可能になる。

本発明の測定方法において、前記測定試料の種類は、特に制限されず、全血、血漿、血清、血球等の他に、例えば、尿、髄液等の生体試料や、  
5 ジュース等の飲料水、醤油、ソース等の食品類等の試料に対しても適用でき、この中でも特に全血試料、血球試料に有用である。例えば、赤血球内の糖化Hbを測定する場合には、全血をそのまま溶血したり、全血から分離した赤血球を溶血し、この溶血試料を測定試料とすればよい。

10 測定対象物の糖化タンパク質としては、例えば、前述のような糖化Hb、糖化アルブミン等があげられるが、好ましくは糖化Hbである。

つぎに、本発明のHb糖化率の測定方法は、糖化Hb量とHb量とからHb糖化率を求める測定方法であって、前記本発明の糖化タンパク質  
15 の測定方法により試料中の糖化Hb量を測定し、他方、前記試料中のHb量を測定し、前記糖化Hb量と前記Hb量とからHb糖化率を求める方法である。本発明によれば、高精度で糖化Hb量を測定できるため、信頼性の高いHb糖化率を得ることができる。なお、「Hb量」とは、糖化されているHbおよび未糖化のHbの両方を含む。

20 本発明において、前記Hb量を測定する方法は、特に制限されないが、試料中のHbをテトラゾリウム化合物で変性させ、得られた変性Hbに特異的な吸収波長で、前記試料の吸光度を測定し、この吸光度から前記試料中のHb量を算出する方法であることが好ましい。未変性Hbは、例えば、酸素と結合した状態や未結合の状態等、その態様によって様  
25 々な吸収波長を有するため、単純に吸光度を測定してもHb量を正確に求めることは困難である。これに対して、テトラゾリウム化合物により

変性させた変性Hbは安定であり、吸収極大を示す波長が一定範囲になるため、容易かつ高精度でHb量を求めることができる。このため、前述のような信頼性の高い糖化Hb量とHb量とから、より一層、信頼性の高いHb糖化率を求めることができる。

5

また、本発明の糖化タンパク質の測定方法を用いて、HbA1cを測定することもできる。例えば、このHbA1cの測定方法は、前記本発明の糖化タンパク質の測定方法による糖化Hb量とHbA1c量との相関関係から作成された検量線を準備し、前記本発明の糖化タンパク質の測定方法から得られた試料中の糖化Hb量を前記検量線に代入することにより前記試料中におけるHbA1c量を求める方法である。

本発明者らは鋭意研究の結果、前記本発明の糖化タンパク質の測定方法により得られる全血中の糖化Hb量が、同じ試料におけるHbA1c量と高い相関関係にあることを見出した。HbA1cは、Hbのβ鎖N末端のα-アミノ基が糖化された糖化Hbをいい、糖化Hbの中でも、糖尿病診断等における特に重要な指標とされている。従来の方法によると、HbA1cの測定は、糖化部分の中でのHbA1cの特徴的構造部分であるβ鎖N末端のα-アミノ基の糖化部分にFAODを特異的に作用させ、その酸化還元反応を測定する必要があった。この場合、例えば、使用するFAODが前記α-アミノ基糖化部分に対して基質特異性が高いことや、前記α-アミノ基糖化部分に十分に作用すること等が要求されているため、特別な方法をとらざるを得なかった。しかし、本発明によれば、高精度で測定される糖化Hb量を基に、HbA1c量を決定できるため、正確かつ簡便なHbA1cの測定が可能になる。したがって、HbA1cの測定を臨床検査等で実用化することができる。

つぎに、本発明の糖化タンパク質の測定キットは、酸化還元反応を用いた糖化タンパク質の測定に使用する測定キットであって、F A O Dを含有する試料の前処理用試薬と、F A O D、酸化還元酵素および発色基質を含有する発色用試薬とを含むことを特徴とする。

- 5      本発明者らは、前述のように測定精度の問題の原因を突き止めた。そして、全血試料中に恒常的な糖化アミノ酸や一過性の外来糖化アミノ酸が存在しても、本発明のように、試料の前処理用試薬にF A O Dを含有させれば、前記酸化還元反応に先立ち、前記前処理試薬を添加することによって、試料中の糖化アミノ酸が分解され、前述のような糖化アミノ
- 10   酸による測定値の上昇が抑制されることを、本発明者らが初めて見出したのである。このため、本発明の測定キットを使用すれば、迅速かつ簡便に酸化還元反応を用いた糖化タンパク質の測定を優れた精度で行うことができ、さらに、点滴を受けた患者の血液試料であっても、同様の条件で測定できる。また、本発明の測定キットを用いた測定は、前述のよ
- 15   うに測定精度に優れるため、各種糖化タンパク質の指標としての信頼性も増し、臨床医療等の分野において有用な測定キットとなる。

- 本発明の測定キットは、測定対象物が、例えば、糖化Hbであることが好ましい。このような測定キットによれば、糖化Hbの糖尿病診断の指標としての信頼性が増し、臨床医療等の分野において有用となるから
- 20   である。

- なお、本発明において、前処理試薬に含有させるF A O Dは、前記糖化アミノ酸を分解するものであるため、前述のように、以下、「分解用F A O D」ともいい、発色用試薬に含有させるF A O Dは、糖化タンパク質に作用させるものであることから、以下、「測定用F A O D」とも
- 25   いう。

本発明の測定キットは、さらに、プロテアーゼを含有するプロテアー

ぜ試薬を含むことが好ましい。前記F A O Dは、糖化タンパク質よりも、糖化アミノ酸やより短い糖化ペプチドに作用し易いという性質を有している。したがって、前記プロテアーゼ試薬により、試料中の糖化タンパク質を分解すれば、さらに発色用試薬における測定用F A O Dが作用し易くなり、測定精度も向上するからである。なお、前記プロテアーゼとしては、前記本発明の糖化タンパク質測定方法と同様のものが使用できる。

本発明の測定キットにおいて、前記プロテアーゼ試薬が、さらにテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを含有することが好ましい。このようにプロテアーゼ試薬にテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを含有させれば、測定感度を向上できると同時に、テトラゾリウム化合物によって、前記試料中に含まれる還元物質等が酸化還元反応に与える影響を除去でき、測定精度をも向上できるからである。

また、前記プロテアーゼ試薬において、プロテアーゼとしてメタロプロテアーゼを使用する場合は、さらにC aおよびN aを含有し、メタロプロテアーゼ濃度が1 0 0 ~ 4 0, 0 0 0 K U / L、C a濃度が0. 1 ~ 5 0 m m o l / L、N a濃度が5 ~ 1 0 0 0 m m o l / Lであることが好ましい。このように、前記濃度範囲になるように、メタロプロテアーゼ、C aおよびN aを共存させれば、メタロプロテアーゼの安定性が向上し、例えば、低温だけでなく常温条件下においてもメタロプロテアーゼの失活を防止して安定に保存することができる。なお、C aおよびN aは、使用時に、それぞれC a <sup>2+</sup>およびN a <sup>+</sup>にイオン化すればよい。

なお、前記プロテアーゼ試薬における各物質の濃度は、前記濃度範囲には限定されず、例えば、その割合が、前記濃度範囲と同様の含有割合であることが好ましい。これは、反応溶液に対する前記プロテアーゼ試

薬の添加割合（希釈率）によって、反応に必要な前記各物質の添加量は調整可能だからである。なお、他の物質や他の試薬についても同様である。

本発明の測定キットとしては、前記前処理用試薬に含有させる分解用  
5 F A O D と、前記発色用試薬に含有させる測定用 F A O D とに、例えば、異なる基質特異性の F A O D を使用する第 1 の測定キットと、同じ F A O D を使用する第 2 および第 3 の測定キットとがあげられる。

本発明において、第 1 の測定キットとしては、前述のように、前処理用試薬に含有させる分解用 F A O D と、発色用試薬に含有させる測定用  
10 F A O D とに、異なる基質特異性の F A O D を使用することが好ましい。このような測定キットを用いれば、前記糖化アミノ酸は分解用 F A O D によって分解され、糖化タンパク質については、前記分解用 F A O D が作用していない異なる糖化部分に、前記測定用 F A O D を作用させることができるため、糖化アミノ酸の影響を受けず、測定精度を向上できる  
15 からである。

具体的には、例えば、前記分解用 F A O D が、糖化  $\alpha$ -アミノ基に特異的に作用する F A O D であり、前記測定用 F A O D が、糖化  $\alpha$ -アミノ基および糖化側鎖アミノ基に特異的に作用する F A O D であることが好ましい。前記測定用 F A O D は、 $\alpha$ -アミノ基糖化部分および側鎖ア  
20 ミノ基糖化部分の両方に作用するため、従来の方法であれば、前述のように  $\alpha$ -アミノ基が糖化された糖化アミノ酸にも作用していた。しかし、本発明の測定キットを使用すれば、前処理用試薬での処理によって、前記糖化アミノ酸は、予め、前記糖化  $\alpha$ -アミノ基に特異的に作用する分解用 F A O D に分解されているため、これに測定用 F A O D が作用す  
25 ることはなく、見かけ上の測定値の増加が抑制されて精度が向上する。また、測定用 F A O D は、前述のように  $\alpha$ -アミノ基糖化部分および側

鎖アミノ基糖化部分の両方に作用するが、予め、糖化タンパク質の $\alpha$ -アミノ基糖化部分も分解用FAODによって分解されているため、本発明における前記発色用試薬で処理すれば、糖化タンパク質の側鎖アミノ基糖化部分のみに測定用FAODを作用させることができる。このため

5、特に側鎖アミノ基の糖化量に特徴がある糖化Hbの測定に、有用な測定キットであるといえる。なお、このような測定キットは、前記本発明の第1の糖化タンパク質の測定方法に利用できる。

つぎに、前記第2の測定キットは、前処理用試薬の前記分解用FAODおよび発色用試薬の前記測定用FAODとして、同じFAODを使用

10し、糖化タンパク質を分解し、かつ、前記分解用FAODを消化失活させるプロテアーゼを含有するプロテアーゼ試薬を含むことが好ましい。

この第2の測定キットの使用方法は、例えば、まず、前処理用試薬を試料に添加して糖化アミノ酸に分解用FAODを作用させた後、プロテアーゼ試薬を添加して糖化タンパク質をプロテアーゼで分解し、あわせて残存する分解用FAODもプロテアーゼにより消化分解する。そして

15、さらに前記発色用試薬を添加して測定用FAODを前記プロテアーゼ分解物に作用させ、前記酸化還元反応を行えばよい。

FAODは、前述のように測定する糖化タンパク質よりも、糖化アミノ酸やより短い糖化タンパク質のペプチド断片に対して作用し易いという性質を有している。このため、分解用FAODを含有する前処理用試薬を添加しても、酵素の反応速度論から、糖化アミノ酸を分解する処理時間においては、前記FAODは糖化タンパク質にはあまり作用しないといえる。しかし、続くプロテアーゼ試薬による処理の間も前記分解用FAODの活性が残存していると、プロテアーゼ処理と併行して、プロ

25テアーゼによる糖化タンパク質分解物（すなわち糖化アミノ酸や糖化タンパク質のペプチド断片）に前記分解用FAODが作用してしまい、後



に測定用 F A O D を含む発色用試薬を添加しても、すでに前記糖化タンパク質の分解物の一部には分解用 F A O D が作用してしまった状態となり、反対に測定精度が低下するおそれがある。したがって、前記第 2 の測定キットのように、糖化タンパク質を分解し、かつ分解用 F A O D を消化失活させるプロテアーゼ試薬を含めば、糖化タンパク質の分解物は、前記分解用 F A O D とは未反応のままで維持され、続いて添加する発色用試薬中の測定用 F A O D と反応することができる。このため測定精度も向上するのである。なお、このような測定キットは、前記本発明の第 2 の糖化タンパク質の測定方法に利用できる。

10 一方、第 3 の測定キットは、分解用 F A O D と測定用 F A O D とに同じ F A O D を用いて場合であっても、前述の第 2 の測定キットのように、プロテアーゼ試薬で残存する分解用 F A O D を失活させなくとも、例えば、前処理用試薬の前記分解用 F A O D 濃度と、発色用試薬の前記測定用 F A O D 濃度とを調整することによって、高精度な測定を実現できる。

15 この場合、例えば、最終的な発色反応溶液における前記分解用 F A O D (A) と測定用 F A O D (B) の添加割合 (活性比 A : B) が、A : B = 1 : 10 ~ 1 : 1000 の範囲になるように、前処理用試薬と発色用試薬の F A O D 濃度を設定することが好ましい。このような添加割合であれば、プロテアーゼ試薬で処理する際に、前記分解用 F A O D が

20 残存しても、酵素の反応速度論の点から糖化タンパク質には作用し難いからである。なお、このような測定キットは、前記本発明の第 3 の糖化タンパク質の測定方法に利用できる。

本発明の測定キットにおいて、前記発色基質は、例えば、酸化により発色する基質や還元により発色する基質等が使用できるが、好ましくは、酸化により発色する基質であり、具体的には、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウムであることが好ましい。

このように、発色基質としてDA-64を使用する場合に、前記プロテアーゼ試薬がテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを含有すると、これらの3つの成分が反応系において混合することにより、DA-64が誤発色を起こす場合がある。このように誤発色が生じると、例えば、発色量の測定においてバックグラウンドが高くなり、また、十分

5 量添加したDA-64が不足するという問題が生じる。しかし、前述のように、各試薬が前記濃度範囲で各成分を含有すれば、反応系におけるDA-64の誤発色も防止される。このため、前記バックグラウンドの上昇も抑制でき、より一層高精度な測定が可能になる。

- 10 本発明の測定キットにおいて、前記前処理用試薬、プロテアーゼ試薬、発色用試薬が、さらに界面活性剤を含んでもよい。

また、前記各種試薬が、CHES、MOPS、MES、Tris、リン酸、TES、TAPS、HEPES、HEPPSO、ホウ酸、トリエタノールアミン、BES、MOPSO、EPPS、POPSO、ADA

15 , PIPES、ACES、Bis-Trisからなる群から選択された少なくとも一つの緩衝剤を含有することが好ましい。前記各種試薬はそれぞれ酵素を含有するため、緩衝剤を添加することにより、例えば、至適pHにおいて前記酵素を作用できるからである。

具体的には、前記前処理用試薬が、さらにCHES、MOPS、TAPS、EPPS、リン酸、HEPPSO、POPSO、ホウ酸からなる

20 群から選択された少なくとも一つの緩衝剤を含有し、そのpHが、8.0～10.0の範囲であることが好ましい。

また、前記プロテアーゼ試薬が、さらにTris、MES、DIPSO、TES、POPSO、HEPES、MOPSO、Bis-Tris

25 , MOPS、ADA、PIPES、ACES、リン酸からなる群から選択された少なくとも一つの緩衝剤を含有し、そのpHが、5.0～7.

0の範囲であることが好ましい。

また、前記発色用試薬が、さらにMES、Tris、リン酸、MOPS、TES、HEPES、HEPPSO、EPPSからなる群から選択された少なくとも一つの緩衝剤を含有し、そのpHが、6.0～9.0

5の範囲であることが好ましい。

前記発色用試薬は、例えば、DA-64等の発色基質の誤発色を防止できることから、さらにアジ化ナトリウムを含むことが好ましい。

前記前処理用試薬は、さらにウリカーゼおよびビリルビンオキシダーゼの少なくとも一方を含むことが好ましい。このようにウリカーゼを含有すれば、例えば、測定試料に含まれる尿酸を分解でき、また、ビリルビンオキシダーゼを含有すれば、ビリルビンを分解できる。この尿酸やビリルビンは還元力を有するため、このように分解すれば、さらに還元物質による影響が除去でき、測定精度を向上できるからである。

本発明の測定キットにおける各試薬の具体的な組成としては、例えば、以下の組成があげられる。

前記前処理用試薬は、例えば、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼが糖化された $\alpha$ -アミノ基に特異的に作用する酵素であり、その濃度が10～5000U/Lの範囲、緩衝剤濃度が5～200mmol/Lの範囲であり、pHが8.0～10.0の範囲であることが好ましい。

前記プロテアーゼ試薬は、例えば、メタロプロテアーゼの濃度が、100～10,000KU/Lの範囲、テトラゾリウム化合物濃度が0.1～10mmol/Lの範囲、アジ化ナトリウム濃度が0.08～4mmol/Lの範囲、Ca濃度が0.1～50mmol/Lの範囲、Na濃度が5～1000mmol/Lの範囲、緩衝剤濃度が0.1～500mmol/Lの範囲であり、pHが5.0～7.0の範囲であることが好ましい。

前記発色用試薬は、例えば、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼが、糖化された $\alpha$ -アミノ基および糖化されたアミノ酸残基側鎖に特異的に作用する酵素であり、その濃度が100～50,000 U/Lの範囲、ペルオキシダーゼ濃度が0.1～400 KU/Lの範囲、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム濃度が0.02～2 mmol/Lの範囲、緩衝剤濃度が10～500 mmol/Lの範囲であり、pHが6～9の範囲であることが好ましい。

本発明の測定キットは、前記本発明の糖化タンパク質の測定方法と同様の試料に適用できる。また、その測定対象物も同様であり、好ましくは糖化Hbである。

なお、本発明の測定キットにおける各種試薬は、各成分を水性溶媒に溶解した液系の試薬でもよいし、使用前に水性溶媒に溶解して使用するドライ系の試薬であってもよい。

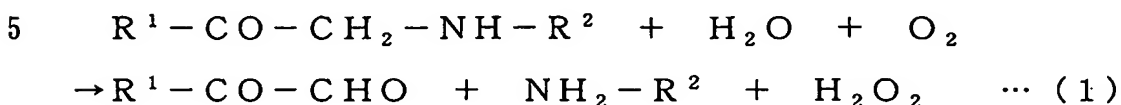
## 15 図面の簡単な説明

図1は、本発明の測定方法の一実施例において、酵素法によるHbA1c量と、HPLC法によるHbA1c量との相関関係を示すグラフである。

## 20 発明を実施するための最良の形態

本発明の測定方法および測定キットにおいて使用するFAODは、下記式(1)に示す反応を触媒するFAODであることが好ましく、例えば、 $\alpha$ -アミノ基が糖化された糖化アミンに特異的に作用するFAOD（以下、「FAOD- $\alpha$ 」という）、アミノ酸残基の側鎖アミノ基が糖化された糖化アミンに特異的に作用するFAOD（以下、「FAOD-S」という）、 $\alpha$ -アミノ基が糖化された糖化アミンおよび前記側鎖アミ

ノ基が糖化された糖化アミンのいずれにも特異的に作用するFAOD（以下、「FAOD- $\alpha$ S」という）等があげられる。なお、「糖化アミン」とは、糖化タンパク質、糖化ペプチドおよび糖化アミノ酸等をいう。



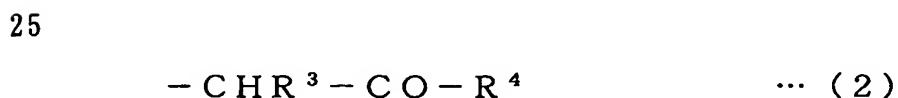
前記式（1）において、 $R^1$ は、水酸基もしくは糖化反応前の糖に由来する残基（糖残基）を意味する。前記糖残基（ $R^1$ ）は、反応前の糖がアルドースの場合はアルドース残基であり、反応前の糖がケトースの場合、ケトース残基である。例えば、反応前の糖がグルコースの場合は、アマドリ転位により、反応後の構造はフルクトース構造をとるが、この場合、糖残基（ $R^1$ ）は、グルコース残基（アルドース残基）となる。この糖残基（ $R^1$ ）は、例えば、



で示すことができ、 $n$ は、0～6の整数である。

前記式（1）において、 $R^2$ は、特に制限されないが、糖化アミンが糖化アミノ酸または糖化ペプチド（糖化タンパク質を含む）の場合、 $\alpha$ -アミノ基が糖化されている場合と、それ以外のアミノ基（アミノ酸側鎖のアミノ基）が糖化されている場合とで異なる。

前記式（1）において、 $\alpha$ -アミノ基が糖化されている場合、 $R^2$ は、下記式（2）で示すアミノ酸残基またはペプチド残基である。この場合に前記式（1）の反応を特異的に触媒するのが前記FAOD- $\alpha$ およびFAOD- $\alpha$ Sである。



前記式（２）において、 $R^3$ はアミノ酸側鎖基を示し、 $R^4$ は水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基を示し、例えば、下記式（３）で示すことができる。下記式（３）において、 $n$ は、０以上の整数であり、 $R^3$ は、前述と同様に、アミノ酸側鎖基を示し、アミノ酸側鎖基は全て同一でも、異なっても良い。



また、前記式（１）において、 $\alpha$ -アミノ基以外のアミノ基が糖化されている（アミノ酸側鎖基が糖化されている）場合、 $R^2$ は下記式（４）で示すことができる。この場合に前記式（１）の反応を特異的に触媒するのが前記FAOD-SおよびFAOD- $\alpha$ Sである。

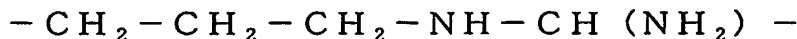


前記式（４）において、 $R^5$ は、アミノ酸側鎖基のうち、糖化されたアミノ基以外の部分を示す。例えば、糖化されたアミノ酸がリジンの場合、 $R^5$ は



であり、

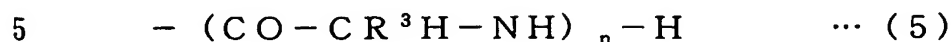
例えば、糖化されたアミノ酸がアルギニンの場合、 $R^5$ は、



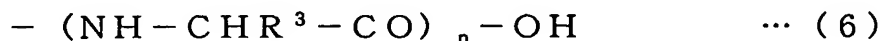
である。

また、前記式（４）において、 $R^6$ は、水素、アミノ酸残基またはペプチド残基であり、例えば、下記式（５）で示すことができる。なお、

下記式（５）において、 $n$ は０以上の整数であり、 $R^3$ は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示し、アミノ酸側鎖基は全て同一でも、異なっても良い。



また、前記式（４）において、 $R^7$ は、水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基であり、例えば、下記式（６）で示すことができる。なお、下記式（６）において、 $n$ は０以上の整数であり、 $R^3$ は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示し、アミノ酸側鎖基は全て同一でも、異なっても良い。



15 前記糖化 $\alpha$ -アミノ基に特異的に作用するFAOD- $\alpha$ としては、例えば、市販の商品名フルクトシル-アミノ酸オキシダーゼ（FAOX-E）（キッコーマン社製）、ペニシリウム属由来のFAOD（特開平８-３３６３８６号公報）等があげられる。前記糖化されたアミノ酸側鎖に特異的に作用するFAOD-Sとしては、例えば、フサリウム属由来  
20 FAOD（日本生物工学会大会 平成１２年度 「Fusarium oxysporum由来アミノ酸オキシダーゼの基質特異性の変換；藤原真紀他」）等があげられる。また、前記糖化 $\alpha$ -アミノ基および糖化アミノ酸側鎖基の両方に作用するFAOD- $\alpha$ Sとしては、例えば、市販の商品名FOD（旭化成社製）、ギベレラ属由来FAOD（特開平８-１５  
25 ４６７２号公報）、フサリウム属由来FAOD（特開平７-２８９２５３号公報）、アスペルギルス属由来FAOD（WO 99/20039）

等があげられる。

本発明におけるテトラゾリウム化合物としては、例えば、テトラゾール環の少なくとも2箇所に環構造置換基を有する構造であることが好ましく、より好ましくは、3箇所に環構造置換基を有する構造である。

前記テトラゾリウム化合物が、前述のように、前記テトラゾール環の少なくとも2箇所に環構造置換基を有する場合、前記置換基を、前記テトラゾール環の2位および3位に有することが好ましい。また、テトラゾリウム化合物が3箇所に環構造置換基を有する場合は、前記置換基を、前記テトラゾール環の2位、3位および5位に有することが好ましい。

また、テトラゾリウム化合物は、少なくとも2つの環構造置換基の環構造がベンゼン環であることが好ましい。前記ベンゼン環以外の環構造置換基としては、例えば、環骨格にSまたはOを含み、かつ共鳴構造である置換基があげられ、例えば、チエニル基、チアゾイル基等である。

また、前記テトラゾリウム化合物は、テトラゾール環の少なくとも3箇所に環構造置換基を有し、前記環構造置換基のうち少なくとも2つの環構造置換基の環構造がベンゼン環であることが好ましい。

また、少なくとも1つの環構造置換基が官能基を有することが好ましく、前記官能基の数が多いことがより好ましい。

前記官能基としては、電子吸引性の官能基が好ましく、例えば、ハロゲン基、エーテル基、エステル基、カルボキシ基、アシル基、ニトロソ基、ニトロ基、ヒドロキシ基、スルホ基等があげられる。この他にも、例えば、ヒドロペルオキシ基、オキシ基、エポキシ基、エピジオキシ基、オキソ基等の酸素を含む特性基や、メルカプト基、アルキルチオ基、メチルチオメチル基、チオキソ基、スルフィノ基、ベンゼンスルホニル



基、フェニルスルホニル基、p-トルエンスルホニル基、p-トリルスルホニル基、トシル基、スルファモイル基、イソチオシアネート基等の硫黄を含む特性基等があげられる。これらの電子吸引性官能基の中でも、好ましくは、ニトロ基、スルホ基、ハロゲン基、カルボキシ基、ヒドロキシ基、メトキシ基、エトキシ基である。また、前記電子吸引性の官能基の他に、例えば、フェニル基 ( $C_6H_5-$ )、スチリル基 ( $C_6H_5CH=CH-$ ) 等の不飽和炭化水素基等もあげられる。なお、前記官能基は、解離によりイオン化していてもよい。

前記テトラゾリウム化合物は、テトラゾール環の2位および3位にベンゼン環を有し、前記ベンゼン環のうち少なくとも一方が、ハロゲン基、カルボキシ基、ニトロ基、ヒドロキシ基、スルホ基、メトキシ基およびエトキシ基からなる群から選択された少なくとも1つの官能基を有することが好ましい。なお、前記両方のベンゼン環が、前記官能基を有してもよい。前記ベンゼン環において、いずれの箇所 (ortho-, meta-, para-) に前記官能基を有してもよい。また、官能基の数も特に制限されず、同じ官能基を有しても、異なる官能基を有してもよい。

前記テトラゾリウム化合物は、例えば、前記テトラゾール環の2位、3位および5位にベンゼン環構造置換基を有する化合物として、例えば、2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩 (以下、「WST-3」ともいう)、2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩、2-(2-メトキシ-4-ニトロフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩、2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウム塩、3,3'-(1,1'-ビフェニル-4,4'-ジル)-ビス(2,5-ジフェニル)-2H-テトラゾリウム塩、3,3'-[3,3'-ジメトキシ-(1,1'-ビフェニル)-

4, 4' -ジル]-ビス[2-(4-ニトロフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウム塩]、2, 3-ジフェニル-5-(4-クロロフェニル)テトラゾリウム塩、2, 5-ジフェニル-3-(p-ジフェニル)テトラゾリウム塩、2, 3-ジフェニル-5-(p-ジフェニル)テトラゾリウム塩、2, 5-ジフェニル-3-(4-スチリルフェニル)テトラゾリウム塩、2, 5-ジフェニル-3-(m-トリル)テトラゾリウム塩および2, 5-ジフェニル-3-(p-トリル)テトラゾリウム塩等があげられる。

また、前記テトラゾリウム化合物は、前述のような化合物には制限されず、この他に、前記テトラゾール環の2箇所にベンゼン環構造置換基および1箇所にその他の環構造置換基を有する化合物も使用でき、例えば、2, 3-ジフェニル-5-(2-チエニル)テトラゾリウム塩、2-ベンゾチアゾイル-3-(4-カルボキシ-2-メトキシフェニル)-5-[4-(2-スルホエチルカルバモイル)フェニル]-2H-テトラゾリウム塩、2, 2' -ジベンゾチアゾイル-5, 5' -ビス[4-ジ(2-スルホエチル)カルバモイルフェニル]-3, 3' -(3, 3' -ジメトキシ-4, 4' -ピフェニレン)ジテトラゾリウム塩および3-(4, 5-ジメチル-2-チアゾイル)-2, 5-ジフェニル-2H-テトラゾリウム塩等があげられる。

また、前記テトラゾール環の2箇所にベンゼン環構造置換基および1箇所に環構造でない置換基を有するテトラゾリウム化合物も使用でき、例えば、2, 3-ジフェニル-5-シアノテトラゾリウム塩、2, 3-ジフェニル-5-カルボキシテトラゾリウム塩、2, 3-ジフェニル-5-メチルテトラゾリウム塩、2, 3-ジフェニル-5-エチルテトラゾリウム塩等があげられる。

前述のテトラゾリウム化合物の中でも、前述のように、環構造置換基を3つ有する化合物が好ましく、より好ましくは、環構造がベンゼン環である置換基を3つ有し、かつ電子吸引性官能基を多く有するものであり、特に好ましくは、W S T-3である。なお、このようなテトラゾリ

ウム化合物は、例えば、塩でもよいし、イオン化された状態等であってもよい。また、このテトラゾリウム化合物は、一種類でもよいし、二種類以上を併用してもよい。

- 5 つぎに、本発明の糖化タンパク質の測定方法について、血球中の糖化Hbを測定する例を、下記実施形態A-1～A-5において説明する。

(実施形態A-1)

- この実施形態は、前記糖化アミノ酸の分解にFAOD- $\alpha$ を、糖化Hbの測定にFAOD- $\alpha$ Sをそれぞれ使用し、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムの存在下で酸化還元反応を行った例である。

- まず、全血をそのまま溶血し、または全血から遠心分離等の常法により血球画分を分離してこれを溶血し、溶血試料を調製する。この溶血方法は、特に制限されず、例えば、界面活性剤を用いる方法、超音波による方法、浸透圧の差を利用する方法等が使用できる。この中でも、操作の簡便性等の理由から、前記界面活性剤を用いる方法が好ましい。

- 前記界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレン-p-t-オクチルフェニルエーテル（Triton系界面活性剤等）、ポリエチレンソルビタンアルキルエステル（Tween系界面活性剤等）、ポリオキシエチレンアルキルエーテル（Brij系界面活性剤等）等の非イオン性界面活性剤が使用でき、具体的には、例えば、Triton X-100、Tween-20、Brij 35等があげられる。前記界面活性剤による処理条件は、通常、処理溶液中の血球濃度が、1～10体積%の場合、前記処理溶液中の濃度が0.01～5重量%になるように前記界面活性剤を添加し、室温で、数秒（約5秒）～10分程度攪拌すればよい。

つぎに、前記溶血試料に対し、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナ

トリウムを添加する。

前記テトラゾリウム化合物は、例えば、処理溶液中の血球濃度が、0.2～2体積%の場合、濃度0.005～400mmol/Lの範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.02～100mmol/Lの範囲、特に好ましくは0.1～50mmol/Lの範囲である。具体的に、前記テトラゾリウム化合物がWST-3の場合は、濃度0.004～16mmol/Lの範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.02～10mmol/Lの範囲、特に好ましくは0.1～5mmol/Lの範囲である。なお、前記テトラゾリウム化合物は、一種類でもよいし、二種類以上を併用してもよい。このようにテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを添加することにより、無添加の場合に比べて、その感度が、約1.2～3倍の範囲で向上する。

また、前記テトラゾリウム化合物（C）とアジ化ナトリウム（D）の添加割合（モル比C：D）は、例えば、C：D＝20：3～20：12の範囲であり、好ましくは20：5～20：11の範囲、より好ましくは20：6～20：10の範囲である。

前記テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムは、そのまま前記溶血試料に添加してもよい。しかし、操作の簡便性等の点から、溶媒に溶解したテトラゾリウム化合物溶液およびアジ化ナトリウム溶液として、または、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムの両方を含有する溶液（テトラゾリウム化合物・アジ化ナトリウム混合液）として使用することが好ましい。

前記各種溶液におけるテトラゾリウム化合物またはアジ化ナトリウムの濃度は、前記溶血試料に添加する場合の希釈倍率等に応じて適宜決定できるが、テトラゾリウム化合物の濃度は、例えば、0.1～10mm

- 0.1/Lの範囲であり、好ましくは、0.6～5 mmol/Lの範囲であり、より好ましくは0.7～2.7 mmol/Lの範囲である。アジ化ナトリウムの濃度は、例えば、0.1～4 mmol/Lの範囲であり、好ましくは、0.15～1.8 mmol/Lの範囲、より好ましくは
- 5 0.2～1.5 mmol/Lの範囲である。また、前記混合液の場合、テトラゾリウム化合物（C）とアジ化ナトリウム（D）との配合割合（モル比C：D）は、C：D＝20：3～20：12の範囲であり、好ましくは20：5～20：11の範囲、より好ましくは20：6～20：10の範囲である。
- 10 前記溶液の溶媒としては、例えば、MOPS、MES、MOPSO、DIPSO、TES、POPSO、HEPES、リン酸等の緩衝液が使用でき、好ましくは、MOPS、MESである。前記溶媒のpHは、例えば、5.0～7.0の範囲であり、好ましくは、5.5～6.5の範囲である。また、前記緩衝液の濃度は、例えば、0.1 mmol/L～
- 15 10 mmol/Lの範囲、好ましくは、1～5 mmol/Lの範囲、より好ましくは1～3 mmol/Lの範囲であり、前記溶血試料に添加した場合の処理溶液における最終濃度は、例えば、0.7～9 mmol/Lの範囲、好ましくは、0.8～4.5 mmol/Lの範囲、より好ましくは0.8～2.7 mmol/Lの範囲である。
- 20 また、より一層の感度向上が可能であることから、調製した前記テトラゾリウム化合物・アジ化ナトリウム混合液を、前記溶血試料に添加する前に、一定時間放置することによってエージングすることが好ましい。このエージング処理によって、感度が、エージングしない場合よりも、例えば、約1.2～3倍に向上する。
- 25 前記エージングにおいて、例えば、処理温度は、40～60℃の範囲が好ましく、より好ましくは50～60℃の範囲である。処理時間は、

例えば、6～72時間の範囲であり、好ましくは15～20時間の範囲である。

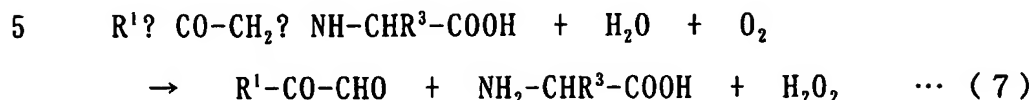
前記溶血試料に対して、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを直接または前記溶液として添加した後、通常、処理温度40～60℃の範囲で、6～72時間インキュベートし、前記試料の前処理を行う。このように試料をテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムで前処理することによって、前述のように感度の向上が達成できると同時に、テトラゾリウム化合物によって、前記試料中に含まれる還元物質等が酸化還元反応に与える影響を除去でき、測定精度をも向上できるからである。このようにテトラゾリウム化合物は、測定精度の向上にも寄与するが、本発明の目的の一つである測定感度の向上には、テトラゾリウム化合物だけでなくアジ化ナトリウムの共存が必要であり、それによって本発明に特有の効果が奏される。

続いて、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを添加した前処理済み溶血試料について、プロテアーゼ処理を行う。これは、後の処理に使用するFAODを測定対象物に作用し易くするためである。また、前述のようにテトラゾリウム化合物の存在下でプロテアーゼ処理を行うため、糖化Hbの分解を迅速に行うこともできる。

前記プロテアーゼとしては、例えば、セリンプロテアーゼ、チオールプロテアーゼ、メタロプロティナーゼ等が使用でき、具体的には、トリプシン、プロテナーゼK、キモトリプシン、パパイン、プロメライン、ズブチリシン、エラスターゼ、アミノペプチダーゼ等が使用でき、好ましくは、前記糖化Hbを選択的に分解する、プロメライン、パパイン、ブタ脾臓由来トリプシン、メタロプロティナーゼ、Bacillus subtilis由来のプロテアーゼ等が好ましい。前記Bacillus subtilis由来プロテアーゼとしては、商品名プロテアーゼN（例えば、フルカ社

- 製)、商品名プロテアーゼN「アマノ」(天野製薬社製)等があげられる。前記メタロプロティナーゼとしては、Bacillus属由来メタロプロティナーゼ(EC 3. 4. 24. 4)(例えば、東洋紡社製:商品名トヨチーム)等があげられる。これらの中でもより好ましくはメタロプロティナーゼ、プロメライン、パパインであり、特に好ましくはメタロプロティナーゼである。このように、選択的に分解するプロテアーゼを使用すれば、糖化Hb分解物を選択的に調製できる。前記プロテアーゼ処理は、通常、緩衝液中で行われ、その処理条件は、使用するプロテアーゼの種類、糖化Hbの濃度等により適宜決定される。
- 10 前記緩衝液としては、例えば、CHES緩衝液、CAPSO緩衝液、CAPS緩衝液、リン酸緩衝液、Tris緩衝液、EPPS緩衝液、HEPES緩衝液等が使用できる。そのpHは、例えば、6~13の範囲であり、好ましくは8~12の範囲、より好ましくは9~11の範囲である。また、プロテアーゼ処理溶液における前記緩衝液の最終濃度は、
- 15 例えば、1. 0~10 mmol/Lの範囲である。
- 具体的には、例えば、前記プロテアーゼとしてメタロプロティナーゼを用いて前記前処理済み溶血試料を処理する場合、通常、反応液中のメタロプロティナーゼ濃度0. 1~40 MU/L、反応液中の血球濃度0. 05~15体積%、反応温度15~37℃、反応時間1分~24時間、pH 6~12の範囲である。
- 20 また、例えば、前記プロテアーゼとしてプロティナーゼKを用いて前記前処理済み溶血試料を処理する場合、通常、反応液中のプロテアーゼ濃度10~300 KU/L、反応液中の血球濃度0. 05~15体積%、反応温度15~37℃、反応時間1分~24時間、pH 6~12の範囲である。また、前記緩衝液の種類も特に制限されず、例えば、トリス塩酸緩衝液、EPPS緩衝液、PIPES緩衝液等が使用できる。
- 25

つぎに、前記プロテアーゼ処理した溶血試料を、前記式（１）の反応、具体的には下記式（７）の反応を触媒するFAOD- $\alpha$ （分解用FAOD）で処理する。



前記式（７）において、 $R^1$ は前述と同様の糖残基を示し、 $R^3$ は前述と同様にアミノ酸側鎖を示す。

10 この処理によって、前記溶血試料に含まれる $\alpha$ -アミノ基が糖化された糖化アミノ酸、および前記糖化Hb分解物のうち $\alpha$ -アミノ基の糖化部分が分解される。

15 なお、前記FAOD- $\alpha$ 処理によっては、糖化アミノ酸の中でも側鎖アミノ基が糖化されたものは分解されずに残存する。しかし、この側鎖が糖化されたアミノ酸の糖化アミノ酸全体に対する割合、および糖化Hbにおける糖化された側鎖アミノ基を有するアミノ酸残基に対する割合から考えても、残存する糖化アミノ酸の影響は小さく、測定精度は十分に向上するといえる。

20 処理条件としては、例えば、反応液中のFAOD- $\alpha$ 濃度10～5000U/L、反応液中の血球濃度0.5～20体積%、反応温度20～50℃、反応時間1分～1時間、pH6～9の範囲である。この処理は、通常、緩衝液中で行われ、前記プロテアーゼ処理と同様の緩衝液が使用できる。

25 つぎに、前記FAOD- $\alpha$ 処理した前記溶血試料を、さらにFAOD- $\alpha$ Sで処理する。このFAOD- $\alpha$ Sは、前述のように、糖化された $\alpha$ -アミノ基および糖化された側鎖アミノ基の両方に作用する。しかし



、糖化Hb分解物は、予め、分解用FAOD- $\alpha$ によって処理されているため、糖化側鎖アミノ基のみに測定用FAOD- $\alpha$ Sを作用させることができる。

このFAOD- $\alpha$ S処理は、前記プロテアーゼ処理と同様に緩衝液中  
5 で行うことが好ましく、前記緩衝液としては、特に制限されず、前記プロテアーゼ処理と同様の緩衝液が使用できる。

処理条件としては、例えば、反応液中のFAOD- $\alpha$ S濃度10～30,000U/L、反応液中の血球濃度0.1～5体積%、反応温度20～50℃、反応時間1分～1時間、pH6～9の範囲である。

10 つぎに、前記FAOD- $\alpha$ S処理で生成した過酸化水素を、酸化酵素および発色基質を用いて、さらに酸化還元反応によって測定する。

前記発色基質としては、例えば、DA-64、オルトフェニレンジアミン(OPD)、トリンダー試薬と4-アミノアンチピリンとを組み合わせた基質等があげられる。前記トリンダー試薬としては、例えば、  
15 フェノール、フェノール誘導体、アニリン誘導体、ナフトール、ナフトール誘導体、ナフチルアミン、ナフチルアミン誘導体等があげられる。また、前記アミノアンチピリンの他に、アミノアンチピリン誘導体、バニリンジアミンスルホン酸、メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン(MBT  
H)、スルホン化メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン(SMBTH)  
20 等も使用できる。このような発色性基質の中でも、特に好ましくは、前述のように、DA-64である。

前記酸化酵素としては、例えば、PODが好ましい。

前記酸化還元反応は、通常、緩衝液中で行われ、その条件は、前記生成した過酸化水素の濃度等により適宜決定される。通常、反応液中のP  
25 OD濃度10～100,000IU/L、発色基質濃度0.005～30mmol/l、反応温度15～37℃、反応時間0.1～30分、p

H 5 ～ 9 である。また、前記緩衝液は、特に制限されず、例えば、前記プロテアーゼ処理および F A O D 処理等と同様の緩衝液等が使用できる。

前記酸化還元反応において、例えば、前記発色基質を用いた場合、前記反応液の発色程度（吸光度）を分光光度計で測定することにより、過酸化水素の量を測定できる。そして、例えば、予め準備した過酸化水素量と糖化 H b 量との相関関係を表わす検量線と、測定した過酸化水素量とを用いて、試料中の糖化 H b 量を求めることができる。

なお、はじめに添加した分解用 F A O D -  $\alpha$  によって生成した過酸化水素は、血液試料（溶血試料）中にはじめから存在するカタラーゼによって消失するため、F A O D -  $\alpha$  S により生成した測定対象物由来の過酸化水素の測定には影響を及ぼすことはない。また、別途カタラーゼを添加して消去させてもよい。このように前記カタラーゼにより過酸化水素を消去する場合、後に行う測定用 F A O D -  $\alpha$  S 処理で生成する過酸化水素までもが消去されることを防ぐために、F A O D -  $\alpha$  S の添加と共に、過剰量の P O D および発色性基質を添加することが好ましい。この場合、P O D は、前記カタラーゼの添加量（U）に対し、例えば、5 ～ 1 0 0 倍の活性（U）量を添加することが好ましい。

また、分解用 F A O D で溶血試料を処理する際に、例えば、さらにウリカーゼ、ビリルビンオキシダーゼ等を添加して同様に処理してもよい。このようにウリカーゼで処理すれば、さらに前記試料中に含まれる尿酸を分解でき、また、ビリルビンオキシダーゼで処理すれば、ビリルビンを分解できる。この尿酸やビリルビンは還元力を有するため、このように処理することによって、さらに還元物質による影響が除去でき、測定精度を向上できる。

前記ウリカーゼまたはビリルビンオキシダーゼの添加割合は、反応液

中の血球濃度が0.2～2体積%の場合、例えば、前記反応液中のウリカーゼ濃度0.1～5000U/L、ビリルビンオキシダーゼ濃度0.1～5000U/Lであり、好ましくは、ウリカーゼ濃度1～2000U/L、ビリルビンオキシダーゼ濃度0.5～1000U/Lであり、  
5 より好ましくはウリカーゼ濃度5～1000U/L、ビリルビンオキシダーゼ濃度2～1000U/Lである。また、その処理条件としては、例えば、前記分解用FAODと同様に行うことができる。

この測定において、前記プロテアーゼ処理は、前述のように前記分解用FAOD- $\alpha$ 処理の前には限られず、例えば、前記FAOD- $\alpha$ 処理  
10 の後に行ってもよい。前記プロテアーゼ処理は、前述のように、FAODを作用し易くするために行うが、前記FAOD- $\alpha$ 処理は糖化アミノ酸の分解を目的として行うため、FAOD- $\alpha$ 処理前にプロテアーゼによって糖化Hbが分解されていなくても、本発明の効果は十分に得ることができるからである。

15 また、本発明の測定方法は、本実施形態の操作順序には限定されず、例えば、同時に行ってもよい工程もある。例えば、溶血処理と、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウム処理と、分解用FAOD処理とを同時に行ってもよく、また、プロテアーゼ処理と、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウム処理とを同時に行うこともできる。なお、  
20 これらの組み合わせには制限されない。

なお、前記過酸化水素量は、前記POD等を用いた酵素的手法の他に、例えば、電気的手法により測定することもできる。

#### (実施形態A-2)

25 この実施形態は、糖化アミノ酸の分解と糖化Hbの測定に、同じFAODを用いた例である。FAODとしては、特に制限されず、例えば、

FAOD- $\alpha$ 、FAOD-S、FAOD- $\alpha$ Sのいずれを用いてもよい。なお、特に示さない限りは、前記実施形態A-1と同様にして測定を行う。

テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを添加した前処理済み

5 溶血試料に分解用FAODを添加する。

具体的な処理条件としては、例えば、反応液中の分解用FAOD濃度10～5000U/L、反応液中の血球濃度0.5～20体積%、反応温度20～50℃、反応時間1分～1時間、pH6～9の範囲である。この処理は、通常、緩衝液中で行われ、前述と同様の緩衝液が使用でき

10 る。

つぎに、分解用FAOD処理した試料に対しプロテアーゼ処理を行う。このプロテアーゼ処理の第1の目的は、前述と同様に、血球由来の糖化Hbを分解し、後の工程でさらに添加する測定用FAODを作用し易くするためである。そして、第2の目的は、前記分解用FAODを消化

15 して失活させるためである。

FAODは、糖化タンパク質よりも糖化アミノ酸に作用し易いため、前記分解用FAOD処理では、糖化アミノ酸が分解される。しかし、この分解用FAODが残っている状態で、前記糖化Hbをプロテアーゼ処理すると、残存する分解用FAODと糖化Hb分解物の糖化部分とが反応してしまい、正確な測定ができないという問題がある。したがって、この残存する分解用FAODをプロテアーゼで失活させ、前記糖化Hb分解物との反応を防止する。このために、はじめに添加した分解用FAODを速やかに失活させ、かつ、糖化Hbを分解できるだけのプロテアーゼを添加する必要がある。

25 前記プロテアーゼとしては、特に制限されず前述と同様のものが使用できる。また、その処理条件は、例えば、使用するプロテアーゼの種類

、糖化Hbの濃度、分解用FAODの種類やその量等に応じて適宜決定される。

プロテアーゼ処理の反応溶液におけるプロテアーゼの添加量は、分解用FAOD 100 U/Lに対して、例えば、1～1000, 000 KU  
5 /Lの範囲であり、好ましくは10～300, 000 KU/Lの範囲であり、より好ましくは100～100, 000 KU/Lの範囲である。

具体的に、プロテアーゼとしてトリプシンを用いて、前記試料を処理する場合、例えば、反応液中のプロテアーゼ濃度1000～30, 00  
0 KU/L、反応液中の血球濃度0.2～5体積%、反応液中のFAO  
10 D濃度10～1000 U/L、反応温度20～50℃、反応時間10分～20時間、pH 6～9の範囲である。

つぎに、前記プロテアーゼ処理により得られた糖化Hb分解物に、分解用FAODと同じFAODを、再度測定用FAODとして添加して処理する。この測定用FAODは、前記プロテアーゼによって失活するお  
15 それがあるため、十分量添加する必要がある。

この測定用FAOD処理も、前述と同様に緩衝液中で行うことが好ましく、前記緩衝液としては、特に制限されず、前記プロテアーゼ処理と同様の緩衝液が使用できる。

測定用FAOD処理の反応溶液における測定用FAODの添加量は、  
20 プロテアーゼ10, 000 KU/Lに対して、例えば、10～1000, 000 U/Lの範囲であり、好ましくは100～200, 000 U/Lの範囲であり、より好ましくは500～50, 000 U/Lの範囲である。

具体的な処理条件としては、例えば、反応液中の測定用FAOD濃度  
25 500～20, 000 U/L、反応液中のプロテアーゼ濃度100～30, 000 KU/L、反応液中の血球濃度0.01～1体積%、反応温

度 15 ~ 40℃、反応時間 1 分 ~ 1 時間、pH 6 ~ 9 の範囲である。

(実施形態 A-3)

この実施形態は、糖化アミノ酸の分解と糖化Hbの測定に、同じFAODを用いた例である。特に示さない限りは、前記実施形態A-1と同様にして測定を行う。

但し、この実施形態は、前記実施形態A-2とは異なり、分解用FAODを、プロテアーゼによって必ずしも失活させる必要がない実施形態である。酵素には基質特異性があるため、プロテアーゼとFAODとの組み合わせによっては、FAODをプロテアーゼで失活させ難い場合がある。このような場合に本実施形態の方法が有効になる。なお、はじめに添加した分解用FAODが、プロテアーゼにより生成した糖化Hb分解物と反応すると、測定精度を向上できないため、以下に示すように、FAODの添加割合を調整することが重要となる。

15     テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを添加した前処理済み溶血試料に、分解用FAODを添加する。

分解用FAODは、プロテアーゼで失活させ難い場合、その活性が残存しても、プロテアーゼ処理の間に、生成した糖化Hb分解物に作用しない範囲で添加する必要がある。また、FAODは糖化アミノ酸に作用しやすく、糖化タンパク質に作用し難いという性質を利用するため、糖化アミノ酸のみに作用する程度の添加量であり、かつ反応時間とすることが好ましい。

FAOD処理の条件としては、例えば、反応液中のFAOD濃度10 ~ 5000 U/L、反応液中の血球濃度0.2 ~ 20体積%、反応温度20 ~ 50℃、反応時間1分 ~ 1時間、pH 6 ~ 9 の範囲である。この処理は、通常、緩衝液中で行われ、前述と同様の緩衝液が使用できる。

つぎに、前記 F A O D 処理した試料に対しプロテアーゼ処理を行う。  
この実施形態は、前述のように、プロテアーゼが前記 F A O D に作用し  
難い場合の例であるため、特にプロテアーゼの添加量は特に制限されな  
い。

- 5 前記プロテアーゼとしては、特に制限されず、前述と同様のものが使用できる。その処理条件は、前述と同様に、使用するプロテアーゼの種類、糖化 H b の濃度、使用するプロテアーゼの F A O D に対する基質特異性等により適宜決定される。

- このような実施形態に該当する F A O D とプロテアーゼの組み合わせ  
10 としては、例えば、商品名 F O D (旭化成社製) と商品名 トヨチーム (東洋紡社製)、前記ギベレラ属由来 F A O D と商品名 プロテナーゼ K (ロシュ社製) のプロテアーゼ等があげられる。

- プロテアーゼとしてトリプシンを用いて、前記試料を処理する場合、  
例えば、反応液中のプロテアーゼ濃度 1 0 0 ~ 6 0 0 0 U / L、反応液  
15 中の血球濃度 0 . 2 ~ 5 体積%、反応液中の F A O D 濃度 1 ~ 1 0 0 U / L、反応温度 2 0 ~ 5 0 ℃、反応時間 1 0 分 ~ 2 0 時間、p H 6 ~ 9 の範囲である。

続いて、前記プロテアーゼ処理により得られた分解物に、再度同じ F A O D を測定用 F A O D として添加する。

- 20 この測定用 F A O D 処理も、前述と同様に緩衝液中で行うことが好ましく、前記緩衝液としては、特に制限されず、前記プロテアーゼ処理と同様の緩衝液が使用できる。

- このように、本実施形態においては、分解用 F A O D (A) と測定用 F A O D (B) の添加割合 (活性比 A : B) を、例えば、前述のように  
25  $A : B = 1 : 50, 000 \sim 1 : 10$  の範囲、好ましくは  $1 : 5000 \sim 1 : 25$  の範囲、より好ましくは  $1 : 500 \sim 1 : 50$  の範囲にする

。このように設定すれば、前記実施形態A-2と異なり前記分解用F A O Dは反応液中に残存するが、この残存したF A O Dの反応速度は非常に遅いため、プロテアーゼ処理工程において、測定に影響を与える程度に、生成した糖化H b分解物に残存F A O Dが作用することはない。

- 5 処理条件としては、例えば、反応液中の測定用F A O D濃度5 0 0 ~ 2 0, 0 0 0 U/L、反応液中のプロテアーゼ濃度1 0 0 ~ 3 0, 0 0 0 K U/L、反応液中の血球濃度0. 0 1 ~ 1 体積%、反応温度1 5 ~ 4 0 ℃、反応時間1 分 ~ 1 時間、p H 6 ~ 9 の範囲である。

10 (実施形態A-4)

この実施形態は、発色基質としてD A - 6 4 を用いて、前記測定用F A O D処理によって生成した過酸化水素を測定する例である。なお、特に示さない限りは、前記実施形態A-1と同様に行う。

- 発色基質としてD A - 6 4 を使用する場合は、D A - 6 4 の誤発色を  
15 防止するために、D A - 6 4、テトラゾリウム化合物、アジ化ナトリウムおよび界面活性剤のそれぞれの前記酸化還元反応溶液における終濃度を以下の範囲に設定する。各成分の終濃度は、通常、D A - 6 4 1 ~ 1 0, 0 0 0  $\mu$  m o l / L、界面活性剤0. 0 1 ~ 2 0 0 m m o l / L、  
テトラゾリウム化合物0. 0 5 ~ 2 0 m m o l / L、アジ化ナトリウム  
20  $\mu$  0. 0 1 ~ 5 m m o l / L の範囲であり、好ましくは、D A - 6 4 2 ~ 1 0 0 0  $\mu$  m o l / L、界面活性剤0. 0 5 ~ 3 0 m m o l / L、  
テトラゾリウム化合物0. 0 1 ~ 1 0 m m o l / L、アジ化ナトリウム  
0. 0 2 ~ 2 m m o l / L の範囲であり、より好ましくはD A - 6 4 3 ~ 3 0 0  $\mu$  m o l / L、界面活性剤0. 1 ~ 1 0 m m o l / L、テト  
25 ラゾリウム化合物0. 5 ~ 8 m m o l / L、アジ化ナトリウム0. 0 8 ~ 0. 8 m m o l / L の範囲である。前記界面活性剤としては、特に制



限されず、例えば、前述や後述のものが使用できる。

この酸化還元反応溶液のpHは、6.0～10.0の範囲が好ましく、より好ましくは6.5～9.0の範囲、特に好ましくは7.0～8.5の範囲である。

- 5 前記界面活性剤の添加は、例えば、DA-64を添加する前または同時に行ってもよいし、溶血試料を調製するために界面活性剤を添加する場合であれば、酸化還元反応の際に界面活性剤が前記濃度範囲になるように、予め添加しておいてもよい。

- 前記DA-64は、酸化還元反応により発色するため、この反応液について、例えば、検出波長600～780nmの範囲における吸光度（発色程度）を分光光度計で測定すれば、過酸化水素の量を測定できる。
- 10

（実施形態A-5）

- つぎに、本発明のHb糖化率の測定方法について、全血を試料とした場合の例をあげて説明する。
- 15

まず、前記実施形態A-1と同様にして、全血を溶血し、溶血試料中の糖化Hb量を測定し、一方、前記溶血試料におけるHb量を測定する。

- Hb量は、例えば、以下に示すようにして測定できる。まず、前記溶血試料に、前述のようなテトラゾリウム化合物を添加し、Hbを変性させる。その添加割合は、例えば、前記溶血試料中の血球濃度が、0.2～2体積%の場合、濃度0.005～400mmol/Lの範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.02～100mmol/Lの範囲、特に好ましくは0.1～50mmol/Lの範囲である。具体的に、前記テトラゾリウム化合物がWST-3の場合、濃度0.004～16mmol/Lの範囲になるように添加することが好まし
- 20
- 25

く、より好ましくは0.02～10 mmol/Lの範囲、特に好ましくは0.1～5 mmol/Lの範囲である。

前記テトラゾリウム化合物は、そのまま使用してもよいが、操作の簡便性や処理効率等の点から、溶媒に溶解したテトラゾリウム化合物溶液として使用することが好ましい。前記溶液の濃度は、テトラゾリウム化合物の種類（例えば、分子量等）等により適宜決定でき、例えば、0.01～120 mmol/Lの範囲であり、好ましくは0.1～50 mmol/Lの範囲、より好ましくは0.2～20 mmol/Lの範囲である。前記溶媒としては、例えば、蒸留水、生理食塩水、緩衝液等が使用でき、前記緩衝液としては、例えば、前述の緩衝液等が使用できる。なお、前記テトラゾリウム化合物は、一種類でもよいし、二種類以上を併用してもよい。

前記テトラゾリウム化合物による処理条件は、特に制限されないが、例えば、温度4～50℃の範囲、処理時間20秒～60分の範囲であり、好ましくは、温度15～40℃の範囲、処理時間20秒～20分の範囲であり、より好ましくは、温度25～37℃の範囲、処理時間30秒～6分の範囲である。

また、このテトラゾリウム化合物処理は、界面活性剤存在下において行うことが好ましい。これによって、さらにHbの変性を促進できるからである。このため、操作の簡便性等から前記試料の溶血時に予めテトラゾリウム化合物を添加しておいてもよい。

前記界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンエーテル、ポリオキシエチレンフェノールエーテル、ポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル等が使用できる。このポリオキシエチレンエーテル等が好ましい。このポリオキシエチレンエーテル $[C_LH_M-O-(CH_2CH_2O)_NH]$ は、ポリオキシ

エチレン鎖と炭化水素鎖とがエーテル結合しており、前記炭化水素鎖としては、例えば、アルキル基、アルキルフェニル基等があげられる。前記ポリオキシエチレン鎖の重量平均重合度（N）は8～23の範囲であり、他方の炭化水素鎖の炭素数（L）は8～18の範囲であることが好ましく、より好ましくは前記重量平均重合度（N）が8～15の範囲であり、炭化水素鎖の炭素数（L）が8～16の範囲であり、特に好ましくは前記重量平均重合度（N）が8～10の範囲であり、炭化水素鎖の炭素数（L）が8～14の範囲である。また、前記炭化水素鎖は、例えば、直鎖でもよく、分岐鎖を有していてもよい。前記ポリオキシエチレンエーテルの具体例としては、例えば、ポリオキシエチレン-p-t-オクチルフェニルエーテル、ポリエチレングリコール（10）ラウリルエーテル、ポリエチレングリコール（9）ラウリルエーテル等があげられる。

より具体的には、例えば、ポリオキシエチレン-p-t-オクチルフェニルエーテルである市販のT r i t o n系界面活性剤等、ポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステルである市販のT w e e n系界面活性剤等、ポリオキシエチレンアルキルエーテルである市販のB r i j系界面活性剤等が使用できる。この他に、例えば、ポリオキシエチレン（10）ラウリルエーテル、商品名N i k k o l B L - 9 E X（ポリオキシエチレンの重量平均重合度Nが9：和光純薬工業社製）等のようなポリオキシエチレン（9）ラウリルエーテル、商品名T e r g i t o l N P X（ポリオキシエチレンの重量平均重合度Nが約10.5：ナカライテスク社製）および商品名T e r g i t o l N P - 4 0（ポリオキシエチレンの重量平均重合度Nが20：ナカライテスク社製）等のようなポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル等も使用できる。なお、これらの界面活性剤は、溶血用の界面活性剤としても使用することがで

きる。

界面活性剤の添加量は、特に制限されないが、例えば、前記溶血試料中の血球濃度が、0.2～1体積%の場合、濃度0.05～50mmol/Lの範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.2～30mmol/Lの範囲、特に好ましくは0.3～10mmol/Lの範囲である。具体的に、前記界面活性剤が商品名Triton X-100の場合、濃度0.2～100mmol/Lの範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは1～30mmol/Lの範囲、特に好ましくは2～20mmol/Lの範囲である。また、商品名Brij 35の場合、濃度0.1～50mmol/Lの範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.5～20mmol/Lの範囲、特に好ましくは1～10mmol/Lの範囲である。

また、前記界面活性剤は、前記テトラゾリウム化合物0.5～5mmolに対して、例えば、0.1～70mmolの範囲になるように添加してもよく、好ましくは0.3～50mmolの範囲、より好ましくは0.4～20mmolの範囲である。具体的に、前記界面活性剤が商品名Triton X-100の場合、テトラゾリウム化合物1mmolに対して、0.2～15mmolの範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.5～10mmolの範囲、特に好ましくは0.7～5mmolの範囲である。また、また、商品名Brij 35の場合、テトラゾリウム化合物1mmolに対して、0.1～10mmolの範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.2～8mmolの範囲、特に好ましくは0.3～4mmolの範囲である。なお、界面活性剤は、試料の溶血時に、予めHb変性を促進できる十分量を添加しておいてもよい。

つぎに、前記変性Hbの吸光度測定を行う。測定波長は、前述のよう

に、520～670 nmの範囲が好ましく、より好ましくは550～660 nmの範囲である。また、前記波長を主波長として二波長測定を行う場合、副波長は、730～900 nmの範囲が好ましく、より好ましくは800～900 nmの範囲であり、特に好ましくは800～850 nmの範囲である。

そして、測定した変性Hbの吸光度と、予め作成した検量線からHb量を求め、前述の測定した糖化Hb量とHb量とから、Hb糖化率を算出できる。

前記検量線は、例えば、既知量のHbを含む標準試料を、前述のHb測定方法および公知の測定方法によって測定し、これらの測定値から作成する。前記公知の測定方法としては、測定精度に優れる方法であれば特に制限されないが、例えば、国際標準であるHiCN法が好ましい。

なお、Hb量を求めるための変性Hbの吸光度測定は、例えば、糖化Hb測定のために調製した溶血試料の一部を分取して、これをHb測定用試料として行ってもよい。しかし、操作を簡便かつ迅速に行えることから、糖化Hbの測定工程において行うことが好ましい。具体的には、例えば、前記実施形態A-1に示す前記糖化Hbの測定において、前記溶血試料にテトラゾリウム化合物を添加した後、前記溶血試料にテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを添加した後、プロテアーゼ処理を行った後、または測定用FAOD処理を行った後等に、変性Hbの吸光度を測定できる。

#### (実施形態A-6)

つぎに、本発明のHbA1cの測定方法について、全血を試料とした場合の例をあげて説明する。

まず、全血試料について、前記実施形態A-1と同様にして糖化Hb

量の測定を行う。他方、糖化HbのうちHbA1c量が既知である糖化Hb標準液を準備し、これについて、前述と同様にして糖化Hb量の測定を行い、この標準液の測定値（糖化Hb量）とHbA1c量との関係を示す検量線を作成する。前述のように、前記糖化Hbの測定値とHbA1c量とは相関関係にあるため、この検量線に、前記全血試料における糖化Hbの測定値を代入すれば、前記全血試料中のHbA1c量を求めることができる。

なお、検量線の作成において、前記糖化Hb量の測定値としては、最終的に求めた糖化Hb量だけでなく、前記糖化Hb量の測定においてP  
10 OD処理によって得られた反応液の吸光度の値でもよいし、前記吸光度から求めた過酸化水素量を使用してもよい。

つぎに、本発明の測定キットについて、測定対象物が糖化Hbである例をあげて説明する。

15 （実施形態B-1）

この実施形態は、前処理用試薬の分解用FAODにFAOD- $\alpha$ を、発色用試薬の測定用FAODにFAOD- $\alpha$ Sをそれぞれ使用した前記第1の測定キットの一例である。

この測定キットは、分解用FAODを含有する前処理用試薬、プロテ  
20 アーゼを含有するプロテアーゼ試薬、および測定用FAOD、酸化還元酵素および発色基質を含有する発色用試薬から構成される。

これらの前処理用試薬、プロテアーゼ試薬、発色用試薬は、それぞれ含有させる成分を水性溶媒に溶解することによって調製できる。

（前処理用試薬）

25 前処理用試薬は、最終的な発色反応溶液において、例えば、10～2000倍に希釈され、好ましくは20～1000倍に希釈される。したがっ

て、前処理用試薬に含まれるF A O D等の濃度は、例えば、この希釈倍率等に応じて適宜決定できる。また、測定試料中の測定対象物または分解する糖化アミノ酸の量に応じて、前処理用試薬の試料への添加量を変化することによって、反応系におけるF A O D等の量を調整してもよい

5 。

具体的には、前処理用試薬における分解用F A O D濃度は、例えば、10～5000U/Lの範囲である。

前記水性溶剤としては、特に制限されないが、例えば、水、前述のような各種緩衝剤を含む緩衝液等があげられる。前記緩衝剤の中でも、好ましくはCHES、MOPS、TAPS、EPPS、リン酸、HEPSSO、POPSO、ホウ酸であり、より好ましくはCHES、MOPS、TAPS、リン酸である。前記緩衝液の濃度は、例えば、5～200mol/Lの範囲であり、好ましくは20～150mol/Lの範囲である。また、前記緩衝液のpHは、例えば、pH8～10の範囲であり、好ましくは8.5～10.0の範囲である。

また、この前処理用試薬は、分離用F A O Dの他に、さらに以下の成分を含有してもよい。

界面活性剤を含有する場合、例えば、前述のような各種界面活性剤が使用できるが、好ましくはポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルである。また、界面活性剤濃度は、例えば、0.03～200mmol/Lの範囲であり、好ましくは0.1～50mmol/Lの範囲である。

ウリカーゼを含有する場合、その濃度は、例えば、1～2000U/Lの範囲であり、また、ピリルビンオキシダーゼを含有する場合、その濃度は、例えば、1～2000U/Lの範囲である。なお、これら両者を含有してもよい。

(プロテアーゼ試薬)

つぎに、プロテアーゼ試薬は、最終的な発色反応溶液において、例えば、1. 1～3 倍に希釈される。したがって、前述の前処理用試薬と同様に、各成分の濃度は、この希釈倍率等に応じて適宜決定でき、また、

5 試料中の糖化Hb量等に応じて、試料への添加量を変化することにより、反応系におけるプロテアーゼ量を調整してもよい。

プロテアーゼとしては、例えば、前述のものが使用できる。プロテアーゼ試薬におけるプロテアーゼ濃度は、プロテアーゼがメタロプロテアーゼの場合、例えば、0. 5～100 MU/Lの範囲であり、好ましくは

10 は1～40 MU/Lの範囲である。

前記水性溶剤としては、特に制限されないが、例えば、水、前述のような各種緩衝剤を含む緩衝液等があげられる。前記緩衝剤の中でも、好ましくはMES、MOPSであり、より好ましくはMESである。前記緩衝液の濃度は、例えば、1～20 mmol/Lの範囲であり、好ましくは

15 くは1～5 mmol/Lの範囲である。また、前記緩衝液のpHは、例えば、pH 5. 0～7. 0の範囲であり、好ましくは5. 5～6. 5の範囲である。

また、このプロテアーゼ試薬は、前記プロテアーゼの他に、さらに以下の成分を含有してもよい。

20 他の成分としては、例えば、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムがあげられる。この場合、前記プロテアーゼ試薬は、例えば、テトラゾリウム化合物濃度が0. 1～10 mmol/Lの範囲、アジ化ナトリウム濃度が0. 05～4 mmol/Lの範囲であり、好ましくはテトラゾリウム化合物濃度が0. 6～5 mmol/Lの範囲、アジ化ナトリウム濃度が0. 15～1. 8 mmol/Lの範囲である。また、テトラゾ

25 リウム化合物(C)とアジ化ナトリウム(D)との添加割合は、(モル



比C : D) は、 $C : D = 20 : 3 \sim 20 : 12$ の範囲であることが好ましく、より好ましくは $C : D = 20 : 5 \sim 20 : 11$ の範囲であり、特に好ましくは $C : D = 20 : 6 \sim 20 : 10$ の範囲である。

また、プロテアーゼとしてメタロプロテアーゼを使用する場合は、さらにCa化合物およびNa化合物を含有してもよい。前記Ca化合物およびNa化合物としては、前記水性溶媒中で、 $Ca^{2+}$ および $Na^{+}$ にイオン化するものであれば特に制限されず、前記Ca化合物としては、例えば、塩化カルシウム( $CaCl_2$ )、 $CaSO_4$ 、 $(CH_3COO)_2Ca$ 等が使用でき、好ましくは $CaCl_2$ 、 $CaSO_4$ である。また、前記Na化合物としては、例えば、塩化ナトリウム( $NaCl$ )、 $CH_3COONa$ 、 $Na_2SO_4$ 、 $NaNO_3$ 等が使用でき、好ましくは $NaCl$ 、 $Na_2SO_4$ である。これらのCa化合物およびNa化合物は、それぞれ一種類でもよいし、二種類以上を併用してもよい。

メタロプロテアーゼの濃度は、前述のように、 $0.5 \sim 100 MU/L$ の範囲であり、好ましくは $1 \sim 40 MU/L$ の範囲である。

一方、前記Ca化合物の濃度は、解離した $Ca^{2+}$ 濃度が $0.1 \sim 5 mmol/L$ の範囲となるように、 $0.1 \sim 50 mmol/L$ の範囲である。また、Na化合物の濃度は、解離した $Na^{+}$ 濃度が $5 \sim 1000 mmol/L$ の範囲となるように、 $5 \sim 1000 mmol/L$ の範囲であり、好ましくは $10 \sim 300 mmol/L$ の範囲である。

#### (発色用試薬)

つぎに発色用試薬は、最終的な発色反応溶液において、例えば、 $2 \sim 20$ 倍に希釈され、好ましくは $3 \sim 10$ 倍、より好ましくは $4 \sim 8$ 倍に希釈される。この場合も前述と同様に、各成分の濃度は、この希釈倍率等に応じて適宜決定でき、また、試料中の糖化Hbや発生する過酸化水素の量に応じて、添加量を変化することにより、反応系における各成分

の量を調整してもよい。

発色用試薬における測定用 F A O D の濃度は、例えば、1 ~ 2 0 0 K U / L の範囲であり、好ましくは 5 ~ 1 0 0 K U / L の範囲である。

酸化還元酵素の濃度は、例えば、1 ~ 1 0 0 0 K U / L の範囲であり、  
5 、好ましくは 1 0 ~ 2 0 0 K U / L の範囲である。前記酸化還元酵素としては、前述のように P O D があげられる。

前記発色基質の濃度は、例えば、0 . 0 0 1 ~ 1 0 0 m m o l / L の範囲であり、好ましくは 0 . 0 0 5 ~ 1 0 m m o l / L の範囲であり、  
10 より好ましくは 0 . 0 2 ~ 1 m m o l / L の範囲である。前記発色基質としては、前述のようなものがあげられる。

前記水性溶剤としては、特に制限されないが、例えば、水、前述のような各種緩衝剤を含む緩衝液等があげられる。前記緩衝剤の中でも、好ましくは T r i s 、リン酸である。前記緩衝液の濃度は、例えば、2 0 ~ 1 0 0 0 m m o l / L の範囲であり、好ましくは 5 0 ~ 5 0 0 m m o  
15 l / L の範囲である。また、前記緩衝液の p H は、例えば、p H 6 ~ 9 の範囲であり、好ましくは 6 . 5 ~ 8 の範囲である。

#### (使用方法)

つぎに、このような測定キットを使用して、血球中の糖化 H b を測定する方法を説明する。

20 まず、前記実施形態 A - 1 と同様にして、全血から溶血試料を調製し、この溶血試料に前記前処理用試薬を添加して、分解用 F A O D を試料中の糖化アミノ酸に作用させてこれを分解する。

この分解用 F A O D -  $\alpha$  S の作用によって、前記溶血試料に含まれる  $\alpha$  - アミノ基が糖化された糖化アミノ酸、および前記糖化 H b 分解物の  
25 うち  $\alpha$  - アミノ基の糖化部分が分解される。なお、前記 F A O D -  $\alpha$  処理によっては、糖化アミノ酸の中でも側鎖アミノ基が糖化されたものは

分解されずに残存する。しかし、この側鎖が糖化されたアミノ酸の糖化アミノ酸全体に対する割合および糖化Hbにおける糖化された側鎖アミノ基に対する割合から考えても、残存する糖化アミノ酸の影響は小さく、測定精度は十分に向上するといえる。

- 5 前記前処理用試薬の添加量は、血球濃度が30～60体積%の溶血試料30 $\mu$ Lに対して、例えば、300～3000 $\mu$ Lの範囲であり、好ましくは600～2400 $\mu$ Lの範囲である。前記前処理用試薬を添加した前処理反応液は、血球濃度1体積%に対して、前記分解用FAOD濃度が10～5000Umol/Lの範囲となることが好ましい。また
- 10 、前記処理溶液のpHは、8～10の範囲が好ましく、より好ましくは8.5～10の範囲である。

この前処理は、前記前処理用試薬を添加してからインキュベートすることが好ましく、その条件は、例えば、10～37℃、0.1～20分間であり、好ましくは15～37℃、0.1～5分間である。

- 15 なお、この前処理用試薬が界面活性剤を含有する場合、例えば、前述のような溶血処理を別途行って溶血試料を調製する必要はない。つまり、前処理用試薬を全血または血球試料に添加することによって、界面活性剤による溶血処理と、分解用FAODによる糖化アミノ酸の分解処理の両方を行うことができるのである。

- 20 この場合、前記前処理用試薬を添加した前処理反応液は、血球濃度1体積%に対して、前記界面活性剤濃度が0.05～50mmol/Lの範囲となることが好ましく、より好ましくは0.2～30mmol/Lの範囲であり、特に好ましくは0.3～10mmol/Lの範囲である。

- また、前記前処理用試薬が、前述のようにウリカーゼ、ビリルビンオキシダーゼを含有する場合、前記処理用試薬は、血球濃度1体積%に対して、前記ウリカーゼ濃度が0.4～4000U/Lの範囲、ビリルビ
- 25

ンオキシダーゼ濃度が0.4～4000 U/Lの範囲となることが好ましく、より好ましくはウリカーゼ濃度が3～1500 U/Lの範囲、ビリルビンオキシダーゼ濃度が1～700 U/Lの範囲であり、特に好ましくはウリカーゼ濃度が5～1000 U/Lの範囲、ビリルビンオキシダーゼ濃度が2～700 U/Lの範囲である。

次に、前記前処理反応液に、プロテアーゼ試薬を添加し、試料中の糖化Hbに分解用FAODを作用させて分解する。

プロテアーゼ試薬の添加量は、例えば、血球濃度が1体積%の前記前処理反応液10  $\mu$ Lに対して、例えば、50～300  $\mu$ Lの範囲であり、好ましくは60～180  $\mu$ Lの範囲である。前記プロテアーゼ試薬を添加したプロテアーゼ反応液は、血球濃度0.1体積%に対して、前記プロテアーゼ濃度が100～50,000 KU/Lの範囲となることが好ましく、より好ましくは300～30,000 KU/Lの範囲である。また、前記プロテアーゼ反応液のpHは、6～9の範囲が好ましく、より好ましくは7～8.5の範囲である。

このプロテアーゼ処理は、前記プロテアーゼ試薬を添加してからインキュベートすることが好ましく、その条件は、例えば、25～37℃、3～30分間であり、好ましくは25～37℃、3～10分間であり、より好ましくは30～37℃、3～5分間である。

また、このプロテアーゼ試薬が前述のようにテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを含む場合、前記プロテアーゼ反応液は、前記プロテアーゼ濃度が100～10,000 KU/Lの範囲であるのに対して、例えば、テトラゾリウム化合物0.1～10 mmol/Lの範囲、アジ化ナトリウム0.08～4.0 mmol/Lの範囲であり、好ましくはテトラゾリウム化合物0.6～5 mmol/Lの範囲、アジ化ナトリウム0.15～1.8 mmol/Lの範囲である。具体的に、テトラ

5      ゾリウム化合物がW S T - 3 の場合、プロテアーゼ反応液における濃度が 0 . 2 ~ 6 m m o l / L の範囲であることが好ましく、より好ましくは 0 . 6 ~ 4 m m o l / L の範囲、特に好ましくは 0 . 7 ~ 2 . 7 m m o l / L の範囲である。このようにテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを添加することにより、無添加の場合に比べて、その感度が、約 1 . 2 ~ 3 倍の範囲で向上する。

10      また、このプロテアーゼ試薬が、前述のようにメタロプロテアーゼを含有し、さらに C a 化合物および N a 化合物を含む場合、前記プロテアーゼ反応液は、前記メタロプロテアーゼ濃度が 1 0 0 ~ 1 0 , 0 0 0 K U / L の範囲であるのに対して、例えば、C a 化合物 0 . 1 ~ 5 0 m m o l / L の範囲、N a 化合物 5 ~ 1 0 0 0 m m o l / L の範囲であり、好ましくは C a 化合物 0 . 2 ~ 1 0 m o l / L の範囲、N a 化合物 1 0 ~ 5 0 0 m o l / L の範囲であり、より好ましくは C a 化合物 0 . 2 ~ 5 m o l / L の範囲、N a 化合物 3 0 ~ 5 0 0 m o l / L の範囲である  
15      。

次に、前記プロテアーゼ反応液に前記発色用試薬を添加し、測定用 F A O D を糖化 H b 分解物に作用させて、前記式 ( 1 ) の反応により過酸化水素を生成させ、これと発色基質とを酸化還元酵素により反応させ、前記発色基質を酸化により発色させる。

20      測定用の F A O D -  $\alpha$  S は、前述のように、糖化された  $\alpha$  - アミノ基および糖化された側鎖アミノ基の両方に作用する。しかし、予め、前処理用試薬中の分解用 F A O D -  $\alpha$  によって処理されているため、糖化された側鎖アミノ基のみに測定用 F A O D -  $\alpha$  S を作用させることができる。

25      発色用試薬の添加量は、例えば、前記プロテアーゼ反応液 1 0 0  $\mu$  L に対して、例えば、5 ~ 1 0 0  $\mu$  L の範囲であり、好ましくは 8 ~ 5 0

$\mu\text{L}$ の範囲であり、より好ましくは $10 \sim 30 \mu\text{L}$ の範囲である。前記発色用試薬を添加した発色反応溶液は、測定用FAOD濃度が $0.5 \sim 200 \text{KU/L}$ の範囲、酸化還元酵素濃度が $1 \sim 1000 \text{KU/L}$ の範囲、発色基質の濃度が $0.001 \sim 100 \text{mmol/L}$ の範囲であることが好ましく、より好ましくは測定用FAOD濃度が $1 \sim 100 \text{KU/L}$ の範囲、酸化還元酵素濃度が $5 \sim 200 \text{KU/L}$ の範囲、発色基質の濃度が $0.005 \sim 10 \text{mmol/L}$ の範囲であり、より好ましくは測定用FAOD濃度が $2 \sim 100 \text{KU/L}$ の範囲、酸化還元酵素濃度が $5 \sim 200 \text{KU/L}$ の範囲、発色基質の濃度が $0.01 \sim 1 \text{mmol/L}$ の範囲である。また、前記発色反応溶液のpHは、 $6 \sim 9$ の範囲が好ましく、より好ましくは $6.5 \sim 8$ の範囲である。

この発色反応は、前記発色用試薬を添加してから一定時間インキュベートすることが好ましく、その条件は、例えば、 $15 \sim 37^\circ\text{C}$ 、 $1 \sim 30$ 分間であり、好ましくは $25 \sim 37^\circ\text{C}$ 、 $3 \sim 10$ 分間であり、より好ましくは $30 \sim 37^\circ\text{C}$ 、 $3 \sim 5$ 分間である。

つぎに、発色基質の発色を測定する。これは、例えば、発色反応溶液の発色程度（吸光度）を分光光度計で測定すればよく、この吸光度から、過酸化水素の量を決定する。そして、例えば、予め準備した過酸化水素量と糖化Hb量との相関関係を表わす検量線と、測定した過酸化水素量とを用いて、試料中の糖化Hb量を求めることができる。

なお、前記本発明の糖化タンパク質はじめに添加した分解用FAOD- $\alpha$ によって生成した過酸化水素は、血液試料（溶血試料）中にはじめから存在するカタラーゼによって消失するため、FAOD- $\alpha$ Sにより生成した測定対象物由来の過酸化水素の測定には影響を及ぼすことはない。しかし、十分に前記過酸化水素を消去するために、前処理用試薬に、さらにカタラーゼを含有させてもよい。このように前記カタラーゼに

より過酸化水素を消去する場合、後に添加する発色用試薬中の測定用 F A O D -  $\alpha$  S 処理によって生成する過酸化水素までもが前記カタラーゼにより消去されることを防ぐために、発色用試薬中の P O D および発色基質を過剰量含有させることが好ましい。

- 5      この場合、前処理用試薬におけるカタラーゼの濃度は、例えば、5 ~ 3 0 0 U / L の範囲であり、好ましくは 1 0 ~ 1 0 0 U / L の範囲であり、より好ましくは 1 0 ~ 7 0 U / L の範囲である。また、前記前処理反応液におけるカタラーゼ濃度は、例えば、1 . 5 ~ 5 0 U / L の範囲であり、好ましくは 1 . 5 ~ 3 0 U / L の範囲であり、より好ましくは
- 10    1 . 5 ~ 1 5 U / L の範囲であり、前記発色反応溶液におけるカタラーゼ濃度は、例えば、1 ~ 5 0 U / L の範囲であり、好ましくは 1 ~ 3 0 U / L の範囲であり、より好ましくは 1 ~ 1 0 U / L の範囲である。

- また、発色用試薬における P O D 濃度は、例えば、5 ~ 1 0 0 0 K U / L の範囲であり、好ましくは 1 0 ~ 2 0 0 K U / L の範囲であり、より好ましくは 2 0 ~ 2 0 0 K U / L の範囲であり、発色反応溶液における P O D の濃度は、例えば、3 ~ 3 0 0 K U / L の範囲であり、好ましくは 5 ~ 2 0 0 K U / L の範囲であり、より好ましくは 1 0 ~ 1 0 0 K U / L の範囲である。
- 15

- また発色反応溶液におけるカタラーゼ (E) と P O D (F) の割合 (活性比 E : F) は、例えば、E : F = 1 : 2 ~ 1 : 4 0 の範囲であり、好ましくは 1 : 3 ~ 1 : 2 0 の範囲であり、より好ましくは 1 : 4 ~ 1 : 1 0 の範囲である。
- 20

- また、発色用試薬における発色基質濃度は、例えば、0 . 0 1 ~ 2 0 0 m o l / L の範囲であり、好ましくは 0 . 0 2 ~ 2 0 m o l / L の範囲であり、より好ましくは 0 . 0 4 ~ 5 m o l / L の範囲であり、発色反応溶液における発色基質の濃度は、例えば、0 . 0 0 1 ~ 1 0 0 m m
- 25

○ 1 / L の範囲であり、好ましくは 0. 0 0 5 ~ 1 0 mm ○ 1 / L の範囲であり、より好ましくは 0. 0 1 ~ 1 mm ○ 1 / L の範囲である。

この測定キットを用いた測定において、各試薬の添加は、前記順序には限定されず、また、同時に添加してよい試薬もある。具体的には、試料に、例えば、前処理用試薬を添加した後、プロテアーゼ試薬と発色用試薬とを同時に添加してもよいし、前処理用試薬とプロテアーゼ試薬とを同時に添加した後に、発色用試薬を添加してもよい。また、試料に、例えば、プロテアーゼ試薬を添加した後、前処理用試薬を添加し、それから発色用試薬を添加してもよい。

- 10      なお、本発明の測定キットを用いれば、H b A 1 c 量を迅速かつ簡便に、精度よく測定することもできる。これは本発明の測定キットを用いて測定した糖化H b 量は、H b A 1 c と高い相関関係にあるからである。具体的には、本発明の測定キットにより測定した糖化H b 量とH b A 1 c 量との相関関係から検量線を作成し、前記測定キットにより試料中の糖化H b 量を測定して、この測定値を前記検量線に代入すればH b A 1 c 量を求めることができる。

#### (実施形態 B-2)

- 20      この実施形態は、前処理用試薬の分解用 F A O D と、発色用試薬の測定用 F A O D とに、同じ F A O D を用いた第 2 の測定キットの一例である。F A O D としては、特に制限されず、例えば、F A O D - α、F A O D - S、F A O D - α S のいずれを用いてもよい。なお、本実施形態の測定キットは、特に示さない限り前記実施形態 B-1 と同様の構成であり、また、同様にして糖化H b の測定に使用できる。

- 25      F A O D は、前述のように糖化タンパク質よりも糖化アミノ酸に作用し易いため、前記分解用 F A O D によって、糖化アミノ酸が分解される



。しかし、前記実施形態B-1と異なり、分解用FAODと測定用FAODとに、同じFAODを使用すると、以下のような問題が生じる。つまり、前処理反応液に、分解用FAODが残存している状態でプロテアーゼ試薬を加え、前記糖化Hbを分解すると、残存するFAODと糖化Hb分解物の糖化部分とが反応してしまい、正確な測定ができないという問題が起こるのである。したがって、同じFAODを使用する場合は、プロテアーゼ試薬のプロテアーゼによって、糖化Hbを分解し、かつ、前記前処理反応液に残存する分解用FAODを失活させて、前記糖化Hb分解物との反応を防止する必要がある。このために、前処理用試薬の分解用FAODを速やかに失活させ、かつ、糖化Hbを分解できるだけのプロテアーゼをプロテアーゼ試薬に含有させる必要がある。

前記プロテアーゼの種類や含有量は、特に制限されないが、例えば、使用するFAODの種類や量、プロテアーゼのFAODに対する基質特異性、糖化Hb量等や、反応溶液への添加による希釈割合によって、適宜決定することが好ましい。このようなFAODとプロテアーゼの組み合わせとしては、例えば、商品名FOD（旭化成社製）と商品名トヨチーム（東洋紡社製）、前記ギベレラ属由来FAODと商品名プロテナーゼK（ロシュ社製）のプロテアーゼ等があげられる。

具体的には、プロテアーゼ反応液におけるプロテアーゼ濃度が、前記分解用FAOD100U/Lに対して、例えば、1～1000, 000KU/Lの範囲になるように前記プロテアーゼ試薬を添加することが好ましく、より好ましくはプロテアーゼ濃度10～300, 000KU/Lの範囲であり、特に好ましくは100～100, 000KU/Lの範囲である。具体的に、プロテアーゼとしてトリプシンを使用する場合は、例えば、前記プロテアーゼ反応液中のトリプシン濃度1000～30, 000KU/L、血球濃度0.2～5体積%、分解用FAOD濃度1

0～100 U/Lとなるように、前記プロテアーゼ試薬を添加することが好ましい。また、反応条件としては、例えば、温度20～50℃、時間10分～20時間、pH6～9である。

また、本実施形態においては、発色用試薬中の測定用FAODまでも  
5 が、前記プロテアーゼによって失活するおそれがあるため、前記測定用FAODを十分量添加する必要がある。

具体的には、測定用FAOD処理の反応溶液における測定用FAOD濃度が、プロテアーゼ10,000 KU/Lに対して、例えば、10～1000,000 U/Lの範囲になるように、前記発色用試薬を添加す  
10 ることが好ましく、より好ましくは測定用FAOD濃度100～200,000 U/Lの範囲、特に好ましくは測定用FAOD濃度500～50,000 U/Lの範囲となるように前記発色用試薬を添加することが好ましい。

具体的な処理条件としては、例えば、反応液中の測定用FAOD濃度  
15 500～20,000 U/L、反応液中のプロテアーゼ濃度100～30,000 KU/L、反応液中の血球濃度0.01～1体積%となるように、前記発色用試薬を添加することが好ましい。また、反応条件としては、例えば、温度15～40℃、時間1分～1時間、pH6～9の範囲である。

20

#### (実施形態B-3)

この実施形態は、前処理用試薬の分解用FAODと、発色用試薬の測定用FAODにFAOD- $\alpha$ Sとに、同じFAODを用いた第3の測定  
25 キットの一例である。但し、この実施形態は、前記実施形態B-2とは異なり、前処理用試薬の分解用FAODを、プロテアーゼによって必ずしも失活させる必要がない。酵素には基質特異性があるため、プロテア

ーゼとF A O Dとの組み合わせによっては、F A O Dをプロテアーゼで失活させ難い場合がある。このような場合に本実施形態の測定キットが有効になる。なお、前処理用試薬中の分解用F A O Dが糖化H b分解物と反応すると、測定精度を向上できないため、以下に示すように、前処理用試薬と発色用試薬とにおけるF A O Dの添加割合を調整することが重要となる。

前記F A O Dとしては、特に制限されず、例えば、F A O D -  $\alpha$ 、F A O D - S、F A O D -  $\alpha$  Sのいずれを用いてもよい。また、本実施形態の測定キットは、特に示さない限り前記実施形態B-1と同様の構成であり、また、同様にして糖化H bの測定に使用できる。

このような実施形態に該当するF A O Dとプロテアーゼの組み合わせとしては、例えば、商品名F O D（旭化成社製）およびギベラ属由来F A O D（アークレイ社製、特開平-1 5 4 6 7 2号公報）と、商品名トリプシン（シグマ社製）および商品名プロティナーゼK（和光純薬工業社製）等があげられる。

前記分解用F A O Dは、その活性が残存しても、プロテアーゼ処理の間に糖化H b分解物に作用しない範囲で添加する必要がある、かつ、糖化アミノ酸に作用しやすく、糖化タンパク質に作用し難いという性質を利用するため、糖化アミノ酸のみに作用する程度の添加量であることが望ましい。

具体的には、前処理用試薬における分解用F A O D濃度は、例えば、1 0 ~ 2 0, 0 0 0 U / L の範囲であり、好ましくは2 0 ~ 1 0, 0 0 0 U / L の範囲であり、より好ましくは1 0 0 ~ 5 0 0 0 U / L の範囲である。発色用試薬における測定用F A O D濃度は0. 5 ~ 2 0 0 K U / L の範囲であり、好ましくは1 ~ 1 0 0 K U / L の範囲であり、より好ましくは2 ~ 1 0 0 K U / L の範囲である。

そして、前記前処理試薬は、前処理反応液において、例えば、分解用 F A O D 濃度 1 0 ~ 5 0 0 0 U / L、血球濃度 0 . 2 ~ 2 0 体積 % となるように添加することが好ましい。

この測定キットを使用する場合、分解用 F A O D を含有する前処理用  
5 試薬による処理は、F A O D が糖化アミノ酸に作用しやすく糖化タンパク質に作用し難いという性質を利用するため、例えば、糖化アミノ酸のみに作用する程度の反応時間であることが好ましい。具体的には、反応温度 2 0 ~ 3 7 ℃、反応時間 1 分 ~ 6 0 分であることが好ましく、より好ましくは反応温度 2 5 ~ 3 7 ℃、反応時間 2 分 ~ 3 0 時間であり、特  
10 に好ましくは反応温度 3 0 ~ 3 7 ℃、反応時間 3 分 ~ 1 0 時間である。

本実施形態においては、発色反応溶液における分解用 F A O D ( G ) と測定用 F A O D ( H ) との割合 ( 活性比 G : H ) が、例えば、G : H = 1 : 3 ~ 1 : 1 0 0 の範囲となるように、前記前処理用試薬および発色用試薬を添加することが好ましく、より好ましくは G : H が 1 : 5 ~  
15 1 : 5 0 の範囲であり、特に好ましくは G : H が 1 : 1 0 ~ 1 : 4 0 の範囲である。このように設定すれば、前記実施形態 2 と異なり前記分解用 F A O D はプロテアーゼ反応溶液中に残存するが、この残存した F A O D の反応速度は非常に遅いため、プロテアーゼ処理工程において、測定に影響を与える程度に、生成した糖化 H b 分解物に残存 F A O D が作  
20 用することはないからである。

#### (実施形態 B-4)

この実施形態は、発色用試薬の発色基質として D A - 6 4 を用いた例である。なお、本実施形態の測定キットは、特に示さない限りは、前記  
25 実施形態 B-1 と同様の構成であり、また、同様にして糖化 H b の測定に使用できる。

プロテアーゼ試薬が、前述のように測定感度の向上のためにテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを含有し、発色用試薬が発色基質としてDA-64を含有する場合、発色反応溶液中で、前記テトラゾリウム化合物、アジ化ナトリウムおよびDA-64が共存することによって、前述のようなDA-64の誤発色が生じてしまう。したがって、この誤発色を防止するためには、以下の組成とすることが好ましい。

前処理用試薬、プロテアーゼ試薬および発色用試薬のうち少なくともいずれかが、界面活性剤を含有することが好ましい。前記界面活性剤としては、例えば、前述のような界面活性剤が使用できる。

10 前処理用試薬に含有させる場合、その濃度は、0.03~200 mmol/Lの範囲であり、好ましくは0.1~50 mmol/Lの範囲である。プロテアーゼ試薬に含有させる場合、その濃度は、0.01~50 mmol/Lの範囲であり、好ましくは0.05~20 mmol/Lの範囲である。発色用試薬に含有させる場合、その濃度は、0.06~  
15 30 mmol/Lの範囲であり、好ましくは0.1~20 mmol/Lの範囲である。

そして、発色反応溶液における各成分が以下の濃度範囲となるように、測定キットの各試薬を添加すればよい。前記発色反応溶液において、例えば、DA-64 0.001~100 mmol/L、界面活性剤  
20 0.002~50 mmol/L、テトラゾリウム化合物0.1~10 mmol/L、アジ化ナトリウム0.08~4 mmol/Lの範囲でありことが好ましく、より好ましくは、DA-64 0.005~10 mmol/L、界面活性剤0.005~20 mmol/L、テトラゾリウム化合物0.6~5 mmol/L、アジ化ナトリウム0.15~1.8 mmol/Lの範囲であり、特に好ましくはDA-64  
25 0.01~1 mmol/L、界面活性剤0.02~10 mmol/L、テトラゾリウム化

合物 0.7 ~ 2.7 mmol/L、アジ化ナトリウム 0.2 ~ 1.5 mmol/L の範囲である。

また、この発色反応溶液の pH は、6.0 ~ 9.0 の範囲が好ましく、より好ましくは 6.5 ~ 8.5 の範囲、特に好ましくは 7.0 ~ 8.0 の範囲である。

5 0 の範囲である。

前記 DA-64 は、酸化還元反応により発色するため、この反応液について、例えば、検出波長 650 ~ 750 nm の範囲における吸光度（発色程度）を分光光度計で測定すれば、過酸化水素の量を測定できる。

## 10 実施例

### （実施例 1）

患者から全血試料を採取し（患者数 163 名）、赤血球を自然沈降させて回収した。そして、この沈降した赤血球画分 10  $\mu$ L に、下記前処理用試薬 600  $\mu$ L を添加して溶血試料を調整した（n = 163）。なお、この試料は、赤血球を自然沈降させた画分を使用するため、血漿も含有している。

（前処理用試薬：pH 9.4）

	CHAPS	50mmol/L
20	界面活性剤（商品名 NIKKOL-BL9EX、ニッコーケミカル社製）	9g/L
	FAOD（商品名 FAOX、キッコーマン社製）	1KU/L

次に、得られた溶血試料 20  $\mu$ L と下記プロテアーゼ試薬 76  $\mu$ L を混合して、37℃ で 5 分間インキュベートした。続いて、さらに下記発色試薬 19  $\mu$ L を添加して 37℃ で 3 分間インキュベートし、この際の波長 751 nm および波長 571 nm における吸光度を測定した。吸光

度の測定には、自動分析装置（商品名 J C A - B M 8、日本電子社製）を使用した。

（プロテアーゼ試薬：p H 5. 5）

5	トリウム化合物（商品名 WST-3、同仁化学社製）	2mmol/L
	N a N <sub>3</sub>	0.6mmol/L
	N a C l	100mmol/L
	C a C l <sub>2</sub>	2mmol/L
	中性プロテアーゼ（アークレイ社製）	4MU/L
10	M E S	1mmol/L

（発色試薬：p H 7. 0）

	商品名 DA-64（和光純薬工業社製）	80 μmol/L
	F A O D（アークレイ株式会社社製）	36KU/L
15	Tris-HCl	380mmol/L
	N a N <sub>3</sub>	0.5mmol/L

そして、予め作成した H b 濃度（g/L）または H b A 1 c 濃度（g/L）と、吸光度との関係を示す各検量線に、測定したそれぞれの吸光度を代入して H b A 1 c 濃度および H b 濃度を求め、下記式から H b A 1 c % を算出した。なお、H b 濃度は波長 7 5 1 n m の吸光度から、H b A 1 c 濃度は波長 5 7 1 n m の吸光度から求めることができる。

$$H b A 1 c (\%) = (H b A 1 c \text{ 濃度} / H b \text{ 濃度}) \times 100$$

25

なお、前記検量線は、以下に示す方法により作成した。まず、H b 濃

度が既知である種々濃度の標準液について、HbA1c測定装置（商品名HA-8160：アークレイ社製）を用いたHPLC法によりHbA1c濃度とHb濃度とを測定した。一方、前記各標準液について、前記実施例と同様の測定方法により、Hb濃度およびHbA1c濃度に相当する吸光度の測定を行った。そして、前記自動測定器による測定値と前記吸光度から一次回帰式を作成し、これを検量線とした。

また、対照例としては、前記実施例1において調製した溶血試料（ $n = 163$ ）を試料とし、前記HPLC法によって測定した値を使用した。

10 以上の結果を図1に示す。同図は、酵素法により測定した実施例1のHbA1c（％）と、HPLC法による対照例のHbA1c（％）との関係を示すグラフである。同図において、実施例の相関式は、「 $y = 1.031x - 0.09$ 」、相関係数は「0.981」であった。

このように、本発明の実施例によれば、対照例の値と非常に近い値が得られ、その相関係数（0.981）も非常に高いことから、優れた精度で糖化Hbを測定できることがわかった。

#### 産業上の利用の可能性

20 以上のように、本発明の糖化タンパク質の測定方法および測定キットは、共存する糖化アミノ酸の影響を排除するため、測定精度に優れる。このため、本発明を、例えば、赤血球中の糖化Hb、HbA1cの測定に適用すれば、従来よりも信頼性の高い測定値が得られるため、糖化HbやHbA1cの糖尿病診断等の指標物質としての重要性がさらに向上する。



## 請 求 の 範 囲

1. 試料中の糖化タンパク質に、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを作用させて、その酸化還元反応を測定することにより糖化タンパク質の量を測定する方法であって、前記試料中に糖化タンパク質とは別に存在する糖化アミノ酸を除去することを目的として、前記酸化還元反応に先立ち、前記糖化アミノ酸にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを作用させて分解し、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムの存在下で、前記酸化還元反応を行う糖化タンパク質の測定方法。
- 10 2. 糖化タンパク質が、糖化ヘモグロビンである請求の範囲 1 記載の測定方法。
3. 糖化アミノ酸にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを作用させる前または作用させた後に、糖化タンパク質をプロテアーゼで分解し、この分解物に、前記糖化タンパク質に作用させるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを作用させて前記酸化還元反応を行う請求の範囲 1 記載の測定方法。
- 15 4. 前記酸化還元反応の測定が、糖化タンパク質にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを作用させて発生した過酸化水素と、発色基質である N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウムとを酸化還元酵素により反応させ、前記発色基質の発色量を測定することによって、過酸化水素量を決定する過酸化水素量の測定であり、前記発色基質を界面活性剤存在下で反応溶液に添加し、前記反応溶液におけるテトラゾリウム化合物の濃度を 0.5 ~ 8 mmol/L の範囲、アジ化ナトリ
- 20
- 25

ウムの濃度を  $0.08 \sim 0.8 \text{ mmol/L}$  の範囲および界面活性剤濃度を  $0.3 \sim 10 \text{ mmol/L}$  の範囲とし、かつ前記反応溶液の pH を  $7.0 \sim 8.5$  とする請求の範囲 1 記載の測定方法。

- 5      5. 糖化アミノ酸に作用させるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼが、糖化された  $\alpha$ -アミノ基に特異的に作用し、糖化タンパク質に作用させるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼが、糖化された  $\alpha$ -アミノ基およびアミノ酸残基の糖化された側鎖アミノ基に特異的に作用する請求の範囲 1 記載の測定方法。

10

6. テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムとを含む溶液をエージングした後に、試料に添加する請求の範囲 1 記載の測定方法。

7. テトラゾリウム化合物が、2-(4-ヨドフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルフィドフェニル)-2H-テトラゾリウム塩である請求の範囲 1 記載の測定方法。
- 15

8. 糖化ヘモグロビン量とヘモグロビン量とからヘモグロビン糖化率を求める測定方法であって、請求の範囲 1 記載の糖化タンパク質の測定方法により試料中の糖化ヘモグロビン量を測定し、他方、前記試料中のヘモグロビン量を測定し、前記糖化ヘモグロビン量と前記ヘモグロビン量とからヘモグロビン糖化率を求めるヘモグロビン糖化率の測定方法。
- 20

9. 酸化還元反応を用いた糖化タンパク質の測定に使用する測定キットであって、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを含有する試料の前処理用試薬と、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、酸化還元酵素および
- 25

発色基質を含有する発色用試薬とを含む糖化タンパク質の測定キット。

10. 糖化タンパク質が、糖化ヘモグロビンである請求の範囲9記載の測定キット。

5

11. 前処理用試薬のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼが、糖化された $\alpha$ -アミノ基に特異的に作用する酵素であり、発色用試薬のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼが、糖化された $\alpha$ -アミノ基およびアミノ酸残基側鎖の糖化されたアミノ基に特異的に作用する酵素である請求の範囲9記載の測定キット。

10

12. さらに、プロテアーゼを含有するプロテアーゼ試薬を含む請求の範囲9記載の測定キット。

13. プロテアーゼが、メタロプロテアーゼ、プロメライン、パパイ  
ン、トリプシン、プロティナーゼK、ズブチリシンおよびアミノペプチ  
ダーゼからなる群から選択された少なくとも一つのプロテアーゼである  
請求の範囲12記載の測定キット。

14. プロテアーゼが、糖化ヘモグロビンを選択的に分解するプロテ  
アーゼであって、メタロプロテアーゼ、プロメライン、パパイ  
ン、膵臓由来トリプシンおよび*Bacillus subtilis*由来のプロテアーゼか  
らなる群から選択された少なくとも一つのプロテアーゼである請求の範  
囲12記載の測定キット。

25

15. プロテアーゼ試薬が、さらにテトラゾリウム化合物およびアジ

化ナトリウムを含有する請求の範囲 1 2 記載の測定キット。

1 6. プロテアーゼ試薬におけるテトラゾリウム化合物 (A) とアジ  
化ナトリウム (B) との含有割合 (モル比 A : B) が、 $A : B = 20 :$   
5  $3 \sim 20 : 12$  の範囲である請求の範囲 1 5 記載の測定キット。

1 7. プロテアーゼ試薬において、プロテアーゼがメタロプロテアー  
ゼであって、さらに Ca および Na を含有し、メタロプロテアーゼ濃度  
が  $100 \sim 40,000 \text{ U/L}$ 、Ca 濃度が  $0.1 \sim 50 \text{ mmol/L}$   
10、Na 濃度が  $5 \sim 1000 \text{ mmol/L}$  である請求の範囲 1 2 記載の測  
定キット。

1 8. 発色基質が N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェ  
ニルアミンナトリウムである請求の範囲 9 記載の測定キット。  
15

1 9. 前処理用試薬および発色用試薬の少なくとも一方が、さらに界  
面活性剤を含む請求の範囲 9 記載の測定キット。

2 0. プロテアーゼ試薬が、さらに界面活性剤を含む請求の範囲 1 2 記  
20 載の測定キット。

2 1. 界面活性剤が、ポリオキシエチレンエーテル、ポリオキシエチ  
レンフェノールエーテル、ポリオキシエチレンソルビタンアルキルエス  
テルおよびポリオキシエチレンアルキルエーテルからなる群から選択さ  
25 れた少なくとも一つの界面活性剤である請求の範囲 1 9 または 2 0 記載  
の測定キット。

22. 前処理用試薬が、さらにCHES、MOPS、TAPS、EP  
PS、リン酸、HEPPSO、POPSOおよびホウ酸からなる群から  
5 選択された少なくとも一つの緩衝剤を含有し、そのpHが、8.0～1  
0.0の範囲である請求の範囲9記載の測定キット。

23. 発色用試薬が、さらにMES、Tris、リン酸、MOPS、  
TES、HEPES、HEPPSOおよびEPPSからなる群から選択  
10 された少なくとも一つの緩衝剤を含有し、そのpHが、6.0～9.0  
の範囲である請求の範囲9記載の測定キット。

24. プロテアーゼ試薬が、さらにTris、MES、DIPSO、  
TES、POPSO、HEPES、MOPSO、Bis-Tris、M  
OPS、ADA、PIPES、ACESおよびリン酸からなる群から選  
15 択された少なくとも一つの緩衝剤を含有し、そのpHが、5.0～7.  
0の範囲である請求の範囲12記載の測定キット。

25 25. テトラゾリウム化合物が、2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-  
5-(2,4-ジスルフィドフェニル)-2H-テトラゾリウム塩である請求の範囲15記載の測定  
20 キット。

26. 前処理用試薬が、さらにウリカーゼおよびビリルビンオキシダ  
ーゼの少なくとも一方を含む請求の範囲9記載の測定キット。

25 27. 発色用試薬が、さらにアジ化ナトリウムを含む請求の範囲9記  
載の測定キット。

28. 前処理用試薬において、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼが糖化された $\alpha$ -アミノ基に特異的に作用する酵素であり、その濃度が10000 U/Lの範囲、緩衝剤濃度が5~200 mmol/Lの範囲  
5 であり、pHが8.0~10.0の範囲である請求の範囲22記載の測定キット。

29. プロテアーゼ試薬が、さらにCa、Naおよび緩衝剤を含有し、プロテアーゼがメタロプロテアーゼであって、前記プロテアーゼ試薬  
10 におけるメタロプロテアーゼの濃度が、100~10,000 KU/Lの範囲、テトラゾリウム化合物濃度が0.1~10 mmol/Lの範囲、アジ化ナトリウム濃度が0.08~4 mmol/Lの範囲、Ca濃度が0.1~50 mmol/Lの範囲、Na濃度が5~1000 mmol/Lの範囲、緩衝剤濃度が0.1~500 mmol/Lの範囲であり、pH  
15 が5.0~7.0の範囲である請求の範囲15記載の測定キット。

30. 発色用試薬において、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼが、糖化された $\alpha$ -アミノ基および糖化されたアミノ酸残基側鎖に特異的に作用する酵素であり、酸化還元酵素がペルオキシダーゼ、発色基質がN-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウムであり、前  
20 記発色試薬における、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの濃度が100~50,000 U/Lの範囲、ペルオキシダーゼ濃度が0.1~400 KU/Lの範囲、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム濃度が0.02~2 mmol/Lの範囲、緩衝剤濃度が10  
25 ~500 mmol/Lの範囲であり、pHが6~9の範囲である請求の範囲23記載の測定キット。

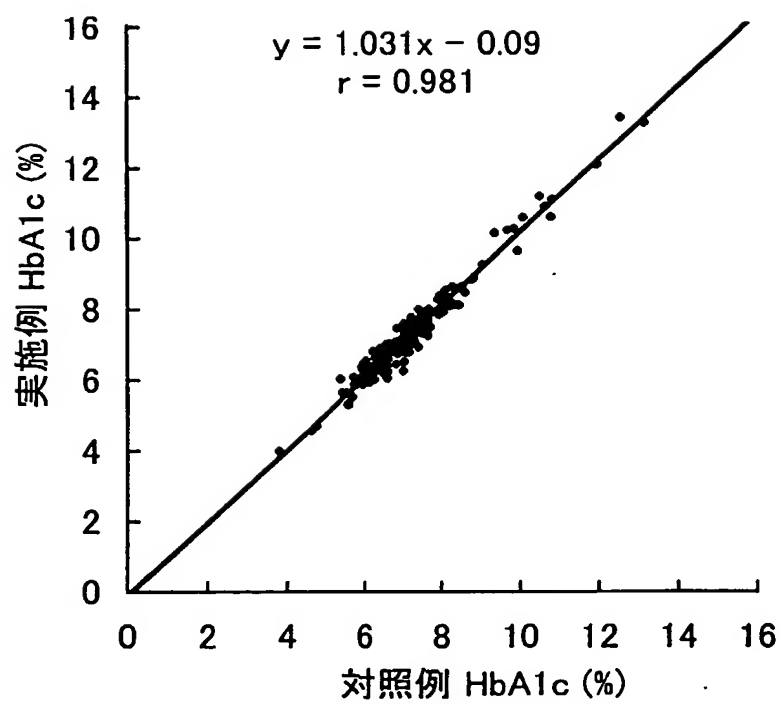


FIG. 1